

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Presencia de Staphylococcus aureus resistente a
metecilina en crianza porcina de traspatio del
departamento de Tumbes**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Heberht Raul Uchuya Doanyre

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

A Dios por la vida, mi familia, los amigos que me ha dado, y por hacerme sentir que en cada paso que doy siempre está presente, así mismo a mis hermanos mayores San Martín de Porres, Santa Rosa de Lima y San Juan Macías.

A mis padres Rosa Donayre y Heber Uchuya, por apoyarme en todo, de manera especial a mi madre que con su esfuerzo, ejemplo y dedicación me guió de la mejor manera, para entender que todo se puede conseguir con mucha esfuerzo y fe.

A mi hermana Katherine Uchuya, por su ejemplo y apoyo que me dio desde pequeño.

A mis abuelitas Juana Ramos y Julia Lengua por cuidarme siempre, ahora desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi alma mater, mi segundo hogar, y a cada uno de los profesores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, por su dedicación en las aulas que permitieron formarme en esta hermosa carrera, y hacerme sentir el amor y el orgullo de lo que significa ser san marquino.

Al Dr. Armando González, por darme la oportunidad de desarrollar la presente tesis, y por motivarme a concluir innumerables veces con el presente trabajo. Gracias por sus consejos enseñanzas y todo el apoyo brindado.

A la Dra. Carmen Sofía Arriola, por brindarme el proyecto de la presente tesis, y por haber confiado en mí desde que estaba en el segundo año de la carrera, gesto del cual nunca me olvidare, así mismo por la calidad de persona y profesional que es, y por quien guardo una gran admiración.

A la M.V. Mariella Güere Calderón, por su paciencia y dedicación durante la realización de la tesis, y por enseñarme como desenvolverse en el laboratorio, enseñanzas que hasta el día de hoy las tengo presente, en verdad agradecido eternamente.

A la M.V. Karen Segovia por su paciencia y apoyo durante la conclusión de la parte de experimental de la tesis.

A la Dra. Sonia Calle, por brindarme todas las facilidades durante la realización de la tesis, en las instalaciones de la Unidad de Bacteriología y Micología.

Al laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria.

A la Unidad de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria. En especial a la Dra. Sonia Calle, ala Dra. Chris Pinto y el Dr. Siever Morales por sus recomendaciones y guía durante el desarrollo de la tesis.

A mi Casa Gris por todos los momentos compartidos. Gracias a cada uno de sus integrantes. En especial a Linda Gallegos Chu y Lisbeth Quintanilla Mejía por su apoyo en la realización de la tesis.

INDICE DEL CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIACIONES.....	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
II.1. Generalidades.....	3
II.1.1 Género <i>Staphylococcus</i>	3
II.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
II.1.2.1.Factores de Virulencia.	5
II.1.3.Medios de Crecimiento.....	6
II.1.3.1. Agar Sangre	6
II.1.3.2 Agar Manitol Salado	7
II.1.4. Pruebas Complementarias para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
II.1.4.1. Tinción Gram.....	8
II.1.4.2. Prueba de Coagulasa	8
II.1.4.3. Prueba de Catalasa	8
II.2. Agentes Antimicrobianos	9
II.2.1 Antibióticos Betalactámicos	10
II.2.2 Mecanismo de acción de los β -lactámicos	11
II.2.3 Penicilinas.....	11
II.2.4 Penicilinas Sintéticas.....	12
II.3.Resistencia a los antimicrobianos:	12
II.3.1.Resistencia a los antibióticos β -lactámicos	13
II.3.2.Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos:	14
II.3.2.1.-Producción de B-lactamasas.....	14
II.3.2.2.-Modificación de los sitios de acción	14
II.3.2.3.-Fenómeno de tolerancia.....	14
II.4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	15
II.4.1 Gen <i>Mec A</i> :	15

II.4.2. Resistencia a meticilina no mediada por el gen <i>mecA</i>	16
II.5. Mecanismos de resistencia a otros agentes antimicrobianos	17
II.5.1. Resistencia a Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas- Ketólidos (MLSK)	17
II.5.2. Resistencia a Glucopéptidos:.....	18
II.5.3. Resistencia a las Fluoroquinolonas.....	18
II.5.4. Resistencia a Tetraciclinas	19
II.5.5. Resistencia a Aminoglucósidos	19
II.6. Técnicas para Detección de Resistencia Bacteriana.....	21
II.6.1. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana	21
II.6.2. Prueba de Látex Aglutinación (PBP2a)	22
II.6.3. Reacción de la Polimerasa en Cadena.....	22
II.7. Evolución de la resistencia antibiótica en <i>S. aureus</i>	23
II.8. Importancia en Salud Pública Veterinaria	24
II.8.1. Uso de Promotores de Crecimiento en Producción Animal.....	24
II.8.2. Uso de Promotores de Crecimiento en Granjas Porcinas.....	25
II.9. Importancia de los SARM en la especie humana.....	25
II.9.1. Modos de adquisición de la infección por SARM: SARM-AH/SARM-AC/ SARM-AL	26
II.9.1.1. SARM asociada a hospitales (SARM-AH):.....	26
II.9.1.2. SARM asociada a la comunidad (SARM-AC)	26
II.9.1.3. SARM asociado a la ganadería (SARM-AL).....	27
II.9.2. Diferencias entre SARM-AC y SARM -AH:	27
II.10. Implicaciones zoonóticas.....	28
II.10.1 SARM en animales	28
II.10.2. SARM en porcinos.....	28
II.10.2.1 SARM-AL ST398.....	29
II.11. SARM-AL ST398 y las infecciones en los seres humanos	30
II.12. Prevalencia en el Perú.....	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
III.1 Materiales	32
III.2 Método experimental	32
III.2.1 Lugar de ejecución.....	32

III.2.2 Animales	33
III.2.3 Toma de muestra	33
III.2.4 Procesamiento de muestras	34
III.2.4.1. Cultivo de Muestras en Agar selectivo Manitol Sal cefoxitina (MAS-Cef)	34
III.2.4.2. Subcultivo de Colonias del género <i>Staphylococcus spp.</i> a Agar Sangre	34
III.2.4.3. Enriquecimiento en caldo cerebro corazón (BHI)	34
III.2.4.4. Prueba de Coagulasa	35
III.2.4.5. Almacenamiento de muestras	35
III.2.5. Identificación genotípica de SARM	35
III.2.6. Análisis de Datos	36
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES / RECOMENDACIONES	42
VII. LITERATURA CITADA	44
VIII. ANEXOS	56

RESUMEN

El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), es una bacteria grampositiva multirresistente, considerada un patógeno crítico en medicina humana, y es una de las causas que lideran las infecciones asociadas a hospitales (SARM-AH). Sin embargo en los últimos años se están incrementando los casos de infecciones asociadas a la comunidad (SARM-AC), y SARM asociado al ganado (SARM-AL). La crianza porcina se identificó como uno de los factores de riesgo emergentes en el incremento de portadores de *S. aureus* a nivel nasal en las infecciones por SARM-AL, probablemente favorecido por el extenso uso de antibióticos. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de SARM en crianza porcina de traspatio en el departamento de Tumbes. Para la ejecución del estudio se tomaron 325 muestras de hisopados nasales de cerdos de crianza de traspatio, previos a su sacrificio. Los hisopados de ambas fosas nasales se inocularon en agar manitol sal cefoxitina 4 µg/ml. Las colonias morfológicamente compatibles con SARM fueron inoculadas en agar sangre al 5% y fueron evaluadas con pruebas bioquímicas para realizar la identificación fenotípica de la bacteria. La reacción en cadena Polimerasa permitió la detección del gen *mecA* en 15 muestras, sin embargo ninguna de ellas fue positiva al gen *nuc*, gen propio de *Staphylococcus aureus*. Los resultados hallados, dieron como negativa la presencia de SARM. Sin embargo podemos estimar la presencia de resistencia a meticilina en 15/79 (coagulasa positiva) de muestras compatibles con *Staphylococcus*. La probabilidad de encontrar un cerdo con SARM se encontraba en el intervalo de confianza del 95% desde 0.00009 a 0.01251. Consecuentemente, se encontraba muy por debajo de la prevalencia límite.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, SARM, cerdos, meticilina, Tumbes

ABSTRACT

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a gram positive bacteria multidrug considered a critical pathogen in human medicine, and is one of the leading causes associated to hospitals infections (HA-MRSA). However in recent years there are increasing cases of community-associated infections (CA-MRSA), and livestock associated MRSA (LA-MRSA). Swine production was identified as one of the emerging risk factors in the increase in nasal carriers of *S. aureus* in LA-MRSA infections, probably aided by the widespread use of antibiotics. The aim of this study was to determine the presence of MRSA in backyard pigs rearing in the department of Tumbes. For the execution of the study 325 samples of nasal swabs from backyard pigs before slaughter were taken. The swabs from both nostrils were inoculated mannitol salt agar-cefoxitin 4 µg / ml. The colonies that were morphologically compatible with MRSA were inoculated on blood agar 5% and were evaluated by biochemical tests for phenotypic identification of the bacteria. Polymerase chain reaction allowed the detection of *mecA* gene in 15 samples; however none of them were positive to the characteristic *nuc* gene of *Staphylococcus*. These results found, showed lack of evidence for MRSA. However, we can estimate the presence of methicillin resistance in 15/79 (coagulase positive) samples compatible with *Staphylococcus*. The probability of finding a MRSA positive pig was within the confidence interval of 95% from 0.00009 to 0.01251. Consequently, it was well below the threshold prevalence.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, pigs, methicillin, Tumbes.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales características de algunos cocos grampositivos. + 90% o más de cepas positivas -90% o más de cepas negativas (+) algunas cepas positivas; (-) algunas cepas negativas; F Fermentativas; O Oxidativa (Quinn *et al.*; 2011)..... 4

Cuadro 2. Diversas enzimas producidas por *S. aureus* (Prescott *et al.*, 1999; Mediavilla y García Lobo, 2003; Winn y Koneman, 2006).....6

Cuadro 3. Criterios de evaluación para el diagnóstico del tipo de hemólisis observada en agar sangre (Güere, 2013).....7

Cuadro 4. Número de muestras procesadas.....39

Cuadro 5: Prevalencia de *Staphylococcus spp.* encontrados durante el proceso de aislamiento.....39

Cuadro 6: Resultados de la prueba de PCR de las 79 muestras positivas a la prueba de coagulasa en tubo.....40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de los antimicrobianos (Borraz, 2006).....	10
Figura 2. Muestra gráficamente los resultados de la simulación. Prevalencia calculada de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....	40
Figura 3. Muestra gráficamente los resultados de la simulación. Prevalencia del gen <i>mec A</i> en porcinos de crianza de traspatio en la provincia de Tumbes.....	40

ABREVIACIONES

µg	Microgramos
µl	Microlitro
®	<i>Registered trademark</i>
TM	Unregistered trademark
ADN	Acido Desoxirribonucleico
BORSA	<i>Bordeline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus</i>
°C	Grados Celsius
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentracion Minima Inhibitoria
CoNS	<i>Coagulase-Negative Staphylococci</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
EFSA	<i>European Food Safety Agency</i>
<i>Fem</i>	<i>Factores esenciales para la expresión de la resistencia a meticilina</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
MAS-Cef	Agar Manitol Sal Cefoxitina 4µg/ml
MGE	<i>Mobile Genetic Element</i>
ml	Mililitro
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multilocus Sequence Typing
mm	Milímetros
MODSA	<i>Moderately resistant s.aureus</i>
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	<i>Penicillin-Binding Protein</i>
PC	Promotores de crecimiento

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PVL	<i>Leucocidina Pantón Vanton</i>
S	Agar Sangre 5% Cordero
SAIV	<i>S. aureus</i> con resistencia intermedia a la Vancomicina
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
SARM-AC	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad
SARM-AH	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina asociado al ganado
SARV	<i>S. aureus</i> con resistencia alta a la Vancomicina
SCC	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome</i>
SCC mec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>
SDP	Sensibilidad Disminuida a la Penicilina
TSB	Caldo Tripticasa Soya
TSS	<i>Toxic Shock Syndrome</i>
TSST-1	<i>Toxic Shock Syndrome Toxin-1</i>
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria grampositiva que habita en el tracto respiratorio superior, en la nariz y garganta, así como en la superficie de la piel del 30 % de la población humana sana (Madigan *et al.*, 1999). Es causante de diversas enfermedades en humanos y animales. El estado de portador de *S. aureus* es considerado un factor de riesgo importante para el desarrollo de una enfermedad invasiva (Enright, 2008).

La aparición y la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos entre los estafilococos, es un problema importante y de preocupación para los hospitales de todo el mundo, debido a la creciente prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) ya que es altamente transmisible (Ayliffe 1997, Gould 2005). SARM también es de cuidado en animales, tales como perros, caballos y cerdos (Loeffler *et al.*, 2005; Weese *et al.*, 2005; Huijsdens. *et al.*, 2006) quienes pueden actuar como reservorios de cepas humanas o pueden ser una oportunidad para la evolución de cepas cada vez más patógenas y resistentes (Lindsay y Holden. *et al.*, 2006).

En la actualidad, se ha demostrado que el contacto con ganado porcino es un factor de riesgo para las infecciones por SARM, ya que los porcinos portadores de SARM a nivel nasal, agravan la situación, debido a la posibilidad de diseminación del patógeno entre cerdos, criadores de cerdos y miembros de familia de los criadores (Vosset *et al.*, 2005).

La emergencia de SARM y de otras bacterias multirresistentes en la industria animal parece estar muy relacionada al uso de antimicrobianos como aditivos en la industria animal. Las cepas *S. aureus* aisladas de granjas porcinas muestran resistencia a los antibióticos usados comúnmente como promotores de crecimiento. Asimismo, el uso de antibióticos como medicación grupal en porcinos, es un factor de riesgo de positividad frente a SARM, a diferencia de las explotaciones con uso restringido de antibióticos donde el chance de ser SARM positivo es mucho menor (Van DuijKeren *et al.*, 2008).

Las infecciones por SARM son de gran importancia y debido a sus características epidemiológicas se ha clasificado en distintas categorías, SARM asociada a hospitales (SARM-AH), SARM asociada a la comunidad (SARM-AC) y SARM asociada a la ganadería (SARM-AL) (Laurence Armand-Lefevreet *al.*, 2005).

Este último grupo epidemiológico, que incluso posee características genéticas distintivas, ha sido relacionado a la crianza porcina. Los humanos en estrecho contacto con cerdos (veterinarios, granjeros y familiares) muestran un riesgo mayor de colonización e infección por este tipo de SARM. De esta manera SARM representa un problema emergente en la práctica veterinaria.

El presente estudio tiene por objetivo determinar la presencia de SARM en crianza porcina de traspatio en el departamento de Tumbes, utilizando métodos selectivos y moleculares.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. Generalidades

II.1.1 Género *Staphylococcus*

Las especies del género *Staphylococcus* son cocos grampositivos de 0,5 a 1µm de diámetro, inmóviles, aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas, generalmente no están capsulados. Crecen bien en medios sintéticos a 35-37°C dando lugar a colonias de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente blancas o ligeramente coloreadas. Las colonias del género *Staphylococcus* son catalasa positivos; en tinciones de muestra directa los microorganismos pueden aparecer en pares, cadenas cortas o racimos (Ogston, 1883; Bustos-Martínez *et al.*, 2006; Salvador, 2012).

Dentro de este género bacteriano existen especies de gran importancia en medicina humana (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) (Higerd y Fowler, 1997) y medicina veterinaria (*S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. aureus*) (Calle, 2006); las cuales pueden ser identificadas como cepas patógenas y relativamente no patógenas en base a la síntesis de la enzima coagulasa (Cuadro 1) (Prescott *et al.*, 1999).

Las cepas *Staphylococcus spp.* coagulasa positivas como *S. aureus*, pueden llegar a causar graves infecciones crónicas, aunque también existen cepas *S. intermedius* y *S. hyicus* que son productoras de coagulasa. Por otro lado, existen los estafilococcus

coagulasa negativos (*Coagulase-Negative Staphylococci*, *CoNS*) como *S. epidermidis*, que no produce pigmento y en general son menos invasores (Prescott *et al.*, 1999).

Cuadro 1. Principales características de algunos cocos grampositivos. + 90% o más de cepas positivas -90% o más de cepas negativas (+) algunas cepas positivas; (-) algunas cepas negativas; F Fermentativas; O Oxidativa (Quinn *et al.*; 2011).

	Coagulasa	Catalasa	Oxidasa	Glucosa	Hemolisis
<i>Staphylococcus</i> patogénico	+	+	-	F	+(-)
<i>Staphylococcus</i> no patogénico	-	+	-	F	-(+)
<i>Enterococcus</i>	-	-	-	F	(+)
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	F	(+)
<i>Micrococcus</i>	-	+	+	O	-(+)

II.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus* de la familia *Micrococcaceae*. Conforman la flora normal de la piel y mucosas; donde las fosas nasales es el principal reservorio del microorganismo (Bustos-Martínez *et al.*, 2006). *S. aureus* es la especie más patógena de las más de 30 especies que forman parte de su género (Van Belkum y Melles, 2005).

S. aureus fue observado por primera vez por Koch y Pasteur. Hacia 1880 el cirujano Sir Alexander Ogston fue quien los denominó con los siguientes términos derivados del griego *staphyle* = racimo y *kokkos* = granos, ya que al observar al microscopio las preparaciones de pus de la supuración y los abscesos de las heridas postoperatorias, observaba agrupamientos de bacterias en formas de racimo de uvas. Rosenbach, en 1884, también lo aisló a partir de abscesos y lo llamó “aureus” por el color amarillo-anaranjado o dorado de sus colonias (Van Belkum y Melles, 2005).

S. aureus crece muy bien en diversos medios de cultivo, sus colonias miden de 1 a 3 mm, son lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, levemente convexas (Bustos-Martínez *et al.*, 2006). Debido a la presencia de carotenoides las cepas de *S. aureus* producen un típico pigmento amarillo, en medios como el agar sangremuchas cepas realizan β hemólisis a las 24-36 horas (Salvador *et al.*, 2005; Bustos-Martínez *et al.*, 2006; Callisaya *et al.*, 2007).

S. aureus resiste al calor, desecación y puede crecer en condiciones de salinidad (7,5% de NaCl). La principal característica que diferencia a *S. aureus* de los demás estafilococos es la producción de la enzima coagulasa (coagula el plasma citratado), mientras que su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol para producir ácido láctico (Salvador *et al.*, 2005; Bannerman, 2003).

II.1.2.1. Factores de Virulencia.

La patogenicidad de *S. aureus* se debe, principalmente a los factores de virulencia, ya que tras la invasión, es capaz de secretar factores de adherencia, toxinas y enzimas (Cuadro 2) (Vincenot *et al.*, 2008). Estos factores explican la frecuencia y gravedad de las infecciones por *S. aureus*.

En el 2005, Salvador *et al.*, clasificaron por la acción de sus determinantes patogénicos a los factores de virulencia en tres grupos:

- 1) Componentes de la pared celular: peptidoglicano (activación del complemento), ácidos teitoicos y proteína A (antifagocitarios) y la cápsula mucoide (adherencia).
- 2) Enzimas: coagulasa (formación de abscesos), catalasa (catalizadora del peróxido de hidrógeno), estafiloquinasas (destrucción del coágulo), hialuronidasa (invasión hística), β -lactamasas (inactivación de β -láctamicos) y lipasas (colonización).
- 3) Toxinas: hemolisinas (rotura de membrana celular), leucocidinas (alteración de la permeabilidad celular), toxina exfoliativa (epidermólisis), toxina TSST-1 (Toxina 1 del síndrome de shock tóxico) y enterotoxina (intoxicación alimentaria).

En el año 2006, Bustos-Martínez, clasificó los factores de virulencia según su función en la patogenia, en tres categorías:

- 1) Factores involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.

- 2) Factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares.
- 3) Factores involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la hemolisina alfa, hemolisina beta, gamma y épsilon.

Cuadro 2. Diversas enzimas producidas por *S. aureus* (Prescott *et al.*, 1999; Mediavilla y García Lobo, 2003; Winn y Koneman, 2006)

Producto	Acción Fisiológica
Catalasa	Inactiva la toxicidad del peróxido de hidrógeno y radicales libres producidos por el sistema mieloperoxidasa. Reduce la muerte por fagocitosis.
Coagulasa	Se une con la protombina y la activa, con lo que cataliza la conversión de fibrinógeno a fibrina. También se puede depositar fibrina en la superficie de la bacteria con lo que pueden evadir la opsonización y fagocitosis.
β-lactamasa	También conocida como penicilinasa, hidroliza al anillo β -lactámico de las penicilinas, con lo que pierden su actividad bactericida.
Fibrinolisisina	Destruye los coágulos de fibrina y facilita la diseminación de la infección a tejidos colindantes.
DNasa	Destruye el DNA.
Fosfolipasa C	Facilita el daño y destrucción por parte de los componentes del sistema del complemento.
Hialuronidasa	También conocida como factor de diseminación, hidroliza la matriz intercelular de ácido hialurónico y permite la dispersión de la bacteria a tejidos adyacentes.

II.1.3. Medios de Crecimiento

II.1.3.1. Agar Sangre

El agar sangre es un medio nutritivo de uso general para el aislamiento de bacterias. El agar sangre permite el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias. Este medio tiene por base una fuente proteica (digeridos trípticos, digeridos proteicos de soya) y una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre (Granados y Villaverde, 1997).

El agar sangre determina la capacidad de algunas bacterias de producir enzimas extracelulares, que actúan sobre los glóbulos rojos (hemolisinas). Las hemolisinas

pueden producir lisis completa (hemólisis beta, produce un halo transparente alrededor de la colonia hemolítica), parcial (hemólisis alfa, coloración verdosa alrededor de la colonia) o por ausencia de alteración (hemólisis gamma). La producción de hemolisinas por las bacterias depende de muchos factores ambientales como pH o atmósfera de incubación (Cuadro 3) (Granados y Villaverde, 1997).

Las colonias de *S. aureus* aisladas en agar sangre, presentan diversas características de cultivo. Las colonias aisladas son de color dorado, presentan forma redonda con bordes bien definidos, de superficie lisa y brillante. Finalmente, las colonias de *S. aureus* pueden llegar a producir beta hemólisis en el agar (Díaz y Ferrán, 2004).

Cuadro 3. Criterios de evaluación para el diagnóstico del tipo de hemólisis observada en agar sangre (Güere, 2013).

Hemólisis	Diagnóstico
Alpha	Presencia de un halo color verde alrededor de la colonia, esta hemólisis incompleta en la cual los glóbulos rojos que rodean las colonias son parcialmente dañados, pero no lisados completamente. El envenenamiento del medio se produce debido a la salida de la célula de un derivado del tipo de la metahemoglobina, que es oxidado a compuestos de tipo de la biliverdina.
Beta	Las colonias del microorganismo aparecen en la placa de agar sangre rodeadas de una zona clara, incolora en la cual los hematíes han experimentado lisis o se ha reducido la hemoglobina (halo transparente)
Gamma	Ausencia de hemólisis, en este tipo de hemólisis no hay daño de la célula, es decir, no hay lisis total o parcial de los glóbulos rojos y por lo tanto no se producen modificaciones en el medio de contacto con la colonia bacteriana.

II.1.3.2 Agar Manitol Salado

El agar manitol salado es un medio selectivo para el aislamiento del género *Staphylococcus spp.* Este agar posee una alta concentración de sal que inhibe el crecimiento de bacterias no estafilocócicas (Durán Vila *et al.*, 2004).

Las colonias de *Staphylococcus spp.*, en este medio, producen ácidos tras fermentar al componente manitol del agar. Estos ácidos reaccionan con el indicador de pH rojo fenol, lo que produce el viraje del agar manitol salado (rosado) hacia amarillo.

Observándose alrededor de las colonias áreas de color amarillo (Durán Vila *et al.*, 2004).

II.1.4. Pruebas Complementarias para la identificación de *Staphylococcus aureus*

II.1.4.1. Tinción Gram

La tinción Gram, es uno de los métodos de rutina más importantes en laboratorios de microbiología. En 1844, fue desarrollada por el bacteriólogo danés Christian Gram. La reacción a la tinción gram permite la división de las bacterias en dos grupos, grampositivas y gramnegativas. En el frotis de *S. aureus*, se observan cocos grampositivos, en una distribución en forma de racimos (Val, 2008).

II.1.4.2. Prueba de Coagulasa

Staphylococcus aureus, posee dos tipos de coagulasa:

1) La endocoagulasa o coagulasa ligada o clumping factor se encuentra unida a la pared celular bacteriana. Esta actúa, directamente sobre el fibrinógeno y lo convierte en fibrina, provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado (test en lámina) (Constantino *et al.*, 2008).

2) La exocoagulasa o coagulasa libre, actúa mediante la activación de procoagulasa (enzima extracelular bacteriana). La exocoagulasa reacciona junto con un factor activador presente en el plasma sanguíneo (similar a la protrombina), dando lugar a un complejo análogo a la trombina. Este complejo reacciona con fibrinógeno formando un coágulo de fibrina en ausencia de Ca^{2+} (Prueba in vitro) (Constantino *et al.*, 2008).

La prueba de coagulasa se puede realizar utilizando diversas variedades de plasmas. Sin embargo, el plasma deshidratado de conejo conteniendo citrato o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es adecuado para la identificación del *S. aureus*. (Rojas *et al.*, 2006).

II.1.4.3. Prueba de Catalasa

Es una prueba bioquímica que permite determinar la presencia de la enzima extracelular catalasa. La enzima catalasa es producida por *S. aureus* durante el crecimiento bacteriano en medios aerobios. Asimismo, esta prueba permite diferenciar

entre el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) del género *Streptococcus* (catalasa negativo) (Díaz *et al.*, 2005; Constantino *et al.*, 2008).

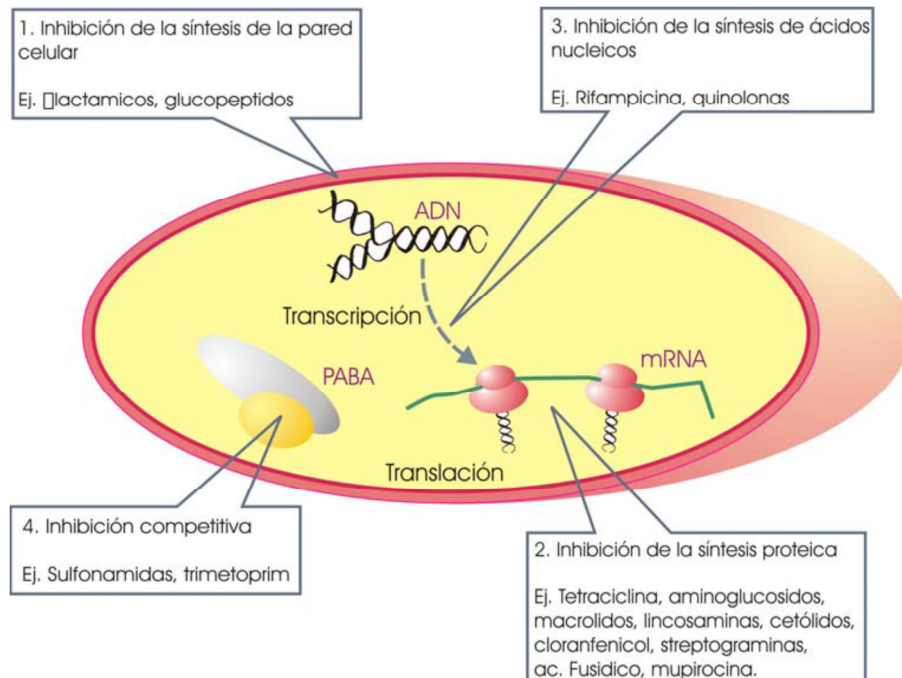
La catalasa favorece la supervivencia de *S. aureus* debido a la capacidad de descomponer al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en agua y oxígeno molecular, evitando el efecto tóxico del H_2O_2 sobre las bacterias. Este último, se genera tras el proceso de estrés oxidativo por parte de los PMN (polimorfonucleados).

La prueba de catalasa es positiva, cuando la enzima catalasa reacciona al contacto con el H_2O_2 , produciendo el desprendimiento de burbujas (reacción positiva) (Díaz *et al.*, 2005; Constantino *et al.*, 2008).

II.2. Agentes Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos o antibióticos son fármacos utilizados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacterias. Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Los límites de ambos conceptos se consideran en la actualidad un tanto difusos, ya que cada grupo de antibióticos, actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Calvo, 2009).

Figura 1. Mecanismos de acción de los antimicrobianos (Borraz, 2006).



II.2.1 Antibióticos Betalactámicos

Los antibióticos β -lactámicos constituyen uno de los grupos más importantes, dentro de la terapéutica antiinfecciosa, puesto que continúan siendo el tratamiento de primera elección en numerosos procesos infecciosos. Estos antibióticos incluyen penicilinas y cefalosporinas. La familia de los antibióticos β -lactámicos se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico, en su estructura química. El anillo β -lactámico necesita un radical anexo a su estructura, para ejercer su actividad antimicrobiana y poder unirse a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs), de esta manera inhibe la síntesis de la pared celular (Neuhaus, 1992).

El tipo de radical que se unen al anillo β -lactámico, es el que define las diferentes clases o grupos de antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenamas, e inhibidores de betalactamasas) (Borraz, 2005).

II.2.2 Mecanismo de acción de los β -lactámicos

Los β -lactámicos actúan sobre el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, inhibiendo la última etapa de su síntesis e induciendo su destrucción. Para ello, deben llegar a su diana de acción, las PBPs—por sus siglas en inglés: *penicillin binding proteins*- o proteínas que se unen a las penicilinas, las cuales son proteínas de alto peso molecular que se localizan generalmente en la cara externa de la membrana citoplasmática. Las PBP son enzimas bifuncionales con actividad transglucolasa y transpeptidasa (Mediavilla *et al*, 2003) Las PBP pueden variar en cuanto a tamaño, número y afinidad por agentes antimicrobianos según la especie bacteriana (Lozano *et al*, 1998; Marin y Gudiol, 2003). La inactivación de las PBPs se hace por formación de complejos covalentes con los β -lactámicos. Por lo tanto, el efecto de un determinado β -lactámico depende de la afinidad que tenga por las diferentes PBPs, ya que cada β -lactámico tiene una afinidad máxima para una PBP concreta. Esta afinidad se define a concentraciones bajas de antibióticos, puesto que si se aumenta la concentración, pueden ser inhibidas otras PBPs (Borraz, 2005).

II.2.3 Penicilinas

Las penicilinas son bactericidas, actúan en fase de multiplicación, mediante la inhibición de las etapas finales de la síntesis del peptidoglucano o mureína, estructura esencial de la pared celular de casi todas las bacterias. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular (Marin y Gudiol, 2003; Mediavilla *et al*, 2003).

Su descubrimiento se debe a Fleming quien en 1928 denominó Penicilina a la sustancia producida por un hongo, *Penicillium notatum*, que provocaba la lisis de diferentes especies de *Staphylococcus* (Fleming, 1929). Estructuralmente la base de las penicilinas consiste en un anillo β -lactámico asociado a otro tiazolidínico de cinco componentes, lo que da origen al núcleo responsable de su actividad biológica, el ácido 6-aminopenicilánico; a él se asocia una cadena lateral cuya extraordinaria variedad determina muchas de las características antibacterianas y farmacocinéticas de las diversas penicilinas (Mediavilla *et al*, 2003).

Las penicilinas también inducen un efecto autolítico, el cual se genera por la activación de una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisinas son inhibidas pero no destruidas, por lo que se dice que son tolerantes (Marin y Gudiol, 2003).

De las varias penicilinas producidas de modo natural, la bencilpenicilina o penicilina G es la única que se usa clínicamente. A ella se asociaron la procaína y la benzatina para prolongar su presencia en el organismo, obteniéndose las respectivas suspensiones penicilina G procaína y penicilina G benzatina (Mediavilla *et al*, 2003).

II.2.4 Penicilinas Sintéticas

Debido al reporte de bacterias que podían destruir la penicilina, que producían penicilinasas, también llamada β -lactamasa se modificó la estructura química del 6-APA mediante la agregación de distintas cadenas laterales, lo que permitió desarrollar un nuevo grupo de antibióticos β -lactámicos, las penicilinas semisintéticas (Borraz, 2005)

Las primeras modificaciones de la molécula penicilina G originaron las fenoxialquilpenicilinas, a las cuales se les introdujo un grupo dimetoxifenil dando lugar a la meticilina. El mismo objetivo se logró con la incorporación del núcleo isoxazolil, que originó el grupo de las isoxazolilpenicilinas: oxacilina, cloxacilina, etc (Mediavilla y García-Lobo, 2003). La adición de estas cadenas laterales a la molécula de penicilina, le confiere resistencia a la inactivación enzimática por las β -lactamasas de *S. aureus*, además de cambiar la actividad antibacteriana y las propiedades farmacológicas del producto (Mandell y Petri, 1998).

II.3. Resistencia a los antimicrobianos:

Una bacteria es considerada como resistente a un agente antimicrobiano cuando la concentración de este último en el sitio de infección no es lo suficientemente alta como para destruir o inhibir la replicación bacteriana. La resistencia antimicrobiana es una

propiedad flexible, ya que varía con respecto al agente antimicrobiano, la bacteria involucrada y el mecanismo de resistencia (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

En Europa diferentes estudios (EASAC, 2007; ECDC/EMEA, 2009; ECDC, EFSA and EMEA, 2009) concluyen que la resistencia a antibióticos es elevada, tanto en bacterias grampositivos como en gramnegativos y está aumentando. Además, dichos estudios encuentran un desfase entre el avance de la multirresistencia y el desarrollo de nuevos antibacterianos.

II.3.1. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos

En 1944, dos años después de la introducción de la penicilina, se informó del primer caso de *S. aureus* resistente a este antibiótico. La resistencia era producida por una enzima que hidrolizaba el anillo β -lactámico de la penicilina y se le denominó penicilinasas (un tipo de β -lactamasa) (Smith y Jarvis, 1999; MacCallum *et al.*, 2010). Debido a la resistencia de las cepas de *S. aureus* a la penicilina, a finales de los años 50 se introdujeron β -lactámicos resistentes a la acción de las penicilinasas como las cefalosporinas y penicilinas semisintéticas.

La meticilina es una penicilina semisintética y se introdujo en Europa en 1959 como antibiótico de elección en el tratamiento de *S. aureus* resistente a la penicilina. Sin embargo, en 1960 se detectó la primera cepa *S. aureus* meticilina resistente ("methicillin resistant *S. aureus*", MRSA) y en 1963, se reportó el primer brote hospitalario causado por cepas SARM.

Los primeros aislamientos de *S. aureus* multirresistentes fueron recobrados en 1957. Desde entonces se han notificado cepas de *S. aureus* multiresistentes en todo el mundo (Bustos-Martínez *et al.*, 2006) y a finales de los años 80, se encuentran cepas de *S. aureus*, que combinan la resistencia a meticilina con la resistencia a otros muchos grupos antibióticos incluyendo cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Schaefer, 1989).

II.3.2.Mecanismos de resistencia a los β -lactámicos:

Los mecanismos de resistencia a β -lactámicos se pueden clasificar en tres tipos (Mediavilla *et al*, 2003).

II.3.2.1.-Producción de B-lactamasas

La producción de β -lactamasas por las bacterias es el mecanismo más importante de resistencia a los β -lactámicos. Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico de estos antibióticos y los convierte en compuestos biológicamente inactivos. En organismos grampositivos, la síntesis de β -lactamasas, suele ser inducible por la presencia de antibiótico (Mediavilla *et al*, 2003).

El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora, que al inhibir el gen represor de la β -lactamasa (gen *blaI*), aumenta la síntesis de penicilinasa (Imsade, 1978). Esta penicilinasa es inactivada por los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) (Borraz, 2005).

La producción de β -lactamasas está controlada por un gen, bien cromosómico o bien transferido por plásmidos o transposones (Mediavilla y García-Lobo, 1998; Marin y Gudiol, 2003).

II.3.2.2.-Modificación de los sitios de acción

Es un mecanismo habitual de resistencia a los β -lactámicos y se basa en la modificación de las proteínas fijadoras de penicilinas (PBPs) sitio de acción de los agentes β -lactámicos, lo que reduce la afinidad de los β -lactámicos a estas proteínas y así disminuye la actividad bactericida de los agentes β -lactámicos. Este mecanismo se observa fundamentalmente en cocos grampositivos (Lozano *et al.*, 1998; Marin y Gudiol, 2003).

II.3.2.3.-Fenómeno de tolerancia

Es un fenómeno que afecta a todos los β -lactámicos y se puede presentar en algunas bacterias. Consiste en la tolerancia al antimicrobiano antes de causar la lisis o muerte

del microorganismo, esta puede manifestarse en un inicio como inhibición de su crecimiento.

La lisis bacteriana se produce con concentraciones que superan entre 4 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un determinado microorganismo.

Los agentes β -lactámicos activan una enzima bacteriana endógena (autolisina). La autolisina destruye el peptidoglicano de la pared celular bacteriana y favorece la lisis.

Finalmente, las bacterias pueden o no sintetizar a la autolisina y por tanto, ser inhibidas por los agentes β -lactámicos pero no destruidas (bacterias tolerantes) (Sopena, 2001). Esto significa que existe una disminución de la actividad autolítica por exceso de un inhibidor de autolisinas, lo que conlleva un efecto bactericida más lento (Sabath, 1977). Se desconoce su base genética.

II.4. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

El elemento central de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la adquisición horizontal del gen *mec A*.

Las cepas de estafilococos se caracterizan por producir al menos cuatro PBPs (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) (Chambers, 1994) que son inhibidas por los β -lactámicos - lactámicos, incluida la meticilina. Las cepas SARM, que contienen el gen *mec A*, sintetiza una PBP2 de baja afinidad a los antibióticos β -lactámicos, y que se ha denominado PBP2a ó PBP 2'. Así cuando las PBPs 1, 2, 3 y 4 están inhibidas por la presencia de meticilina, las PBP2a presentes continúan la reacción de transpeptidación manteniendo de esta manera la síntesis de la pared celular (De Lencastre, 1991; Lim, 2002; Mediavilla *et al.*, 2003, Pantosti *et al.*, 2007).

Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los β -lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos (Borraz, 2005).

II.4.1 Gen *Mec A*:

El gen *mecA* es el determinante genético de resistencia a meticilina. Este gen se encuentra en un elemento genético móvil grande, conocido como cassette cromosomal estafilocócico *mec* ("staphylococcal cassette chromosome *mec*", SCC*mec*) (Hartman,

1984; Ubukata, 1985; Chambers, 1985; Chambers, 1987, Bustos Martinez *et al*, 2006). El origen de SCC*meces* desconocido y no ha habido ningún informe de SCC*mecen* bacterias distintas a estafilococos (Hiramatsu, 2001)

El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP) de 78 kDa, llamada PBP2a, la cual presenta baja afinidad para la meticilina y todos los antibióticos β -lactámicos que se han desarrollado. (Velázquez-Meza, 2005; Foster., 2004; Hiramatsu *et al*, 2001). Esta secuencia cuenta con dos genes reguladores: el gen *mecR1* o gen regulador de la señal de transducción del gen *mecA* y el gen *mecI*, que codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA* (De Lencastre, 1994). La transcripción del gen *mecA* se produce cuando el β -lactámico llega a la célula y se une al receptor-dominio de unión a penicilina de la membrana citoplasmática codificado por el gen *mecR1*, desencadenando una señal que induce a la proteasa autocatalítica a unirse a *mecI*, el cual está bloqueando la región operadora de *mecA*. De ésta manera queda libre el operador de *mec* Asiendo posible la expresión de PBP2a (Zhang, 2001; Archer, 2001; Hiramatsu, 2001).

II.4.2. Resistencia a meticilina no mediada por el gen *mecA*

Se han descrito otros mecanismos de resistencia a meticilina en cepas que no son portadoras del gen *mecA* y que se asocian a CMI (concentraciones mínimas inhibitorias) de meticilina entre 8 y 16 μ g/mL (Jehl, 2004). Estos mecanismos son los siguientes:

- **Hiperproducción de penicilinasa**, son las denominadas cepas BORSA (*borderline S. aureus*), estas cepas sintetizan una cantidad importante de β -lactamasa y no tienen ni el gen *mecA* ni la PBP2a. En las cepas BORSA la sensibilidad a la oxacilina puede recuperarse cuando se asocia con un inhibidor de β -lactamasa, siendo éste el mejor método para su detección fenotípica. No suelen presentar resistencia asociada a otros grupos antibióticos (McDougal, 1986)

- **Determinadas cepas parecen producir una meticilinasa** capaz de hidrolizar la meticilina en ausencia del gen *mecA*, pero su relevancia y el gen responsable no están claramente establecidos (Massidda, 1996)
- **Modificación de las PBPshabituales en *S. aureus***, son las cepasMODSA (*modified S. aureus*), cepas resistentes de bajo nivel a la oxacilina y no productoras de β -lactamasa. Estas cepas presentan una modificación en la afinidad de sus PBPs normales frente a los β -lactámicos, ello puede ser debido a la hiperexpresión de alguna de estas PBPs o la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antibiótico (Sierra-Madero, 1988; Tomasz, 1989).

II.5.Mecanismos de resistencia a otros agentes antimicrobianos

II.5.1. Resistencia a Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas-Cetólidos (MLSK)

Los macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina), streptogramina b (quinopristina-dalfopristina) y ketólidos (picromicina, narbomicina), llamados MLSBK, inhiben la síntesis de proteínas impidiendo el ensamblaje y unión de la partícula ribosomal 50S a la subunidad ribosomal 50S (MacCallum *et al.*, 2010). Los macrólidos y lincosamidas se consideran agentes bacteriostáticos. Las estreptograminas A y B por separado son bacteriostáticos, mientras que en conjunto son sinérgicos y actúan como bactericidas. Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas son un grupo de agentes antimicrobianos alternativos en el tratamiento de las infecciones por *S.aureus* (Sopena, 2001)

La resistencia a los MLSK se debe a la metilación o dimetilación del rRNA ribosomal por medio de enzimas metiltransferasas. Esto confiere resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y streptograminab, y también puede extenderse a los ketólidos. Los genes *erm* poseen el código para la producción de una enzima ARN metilasa que modifica la zona ribosómica de unión de los macrólidos, lincosamidas y streptograminab (Matsuoka *et al.*, 1998).

Un segundo mecanismo de resistencia a la eritromicina es mediado por el gen *msrA*. Este gen codifica la producción de una bomba de eflujo que expulsa la

eritromicina fuera de la célula. Las cepas *msrA* son susceptibles a clindamicina pero son resistentes a eritromicina (Oliver, 2012)

II.5.2. Resistencia a Glucopéptidos:

La vancomicina, glucopéptido propiamente dicho, y la teicoplanina, antibiótico lipoglucopeptido, poseen un excelente actividad frente a bacterias grampositivas. El mecanismo de acción de ambos fármacos consiste en inhibir la síntesis de la pared bacteriana, impidiendo la polimerización del peptidoglicano. Secundariamente alteran la permeabilidad celular y la síntesis de RNA. Ejercen una rápida acción bactericida, pero sólo sobre bacterias en crecimiento activo. (Borraz, 2005)

Se han descrito cepas con reducida sensibilidad a la vancomicina denominadas *S. aureus* vancomicina-intermedio (siglas en inglés, vancomycin intermedius *S. aureus* o VISA) (Smith y Jarvis, 1999; MacCallum *et al.*, 2010) y cepas *S. aureus* con heterorresistencia a vancomicina (hetero-VISA) (Hiramatsu, 1997). La resistencia a la vancomicina se debe a la adquisición del gen *van*. El gen *van* se transfiere a través de un plásmido. Finalmente, cambios en la biosíntesis del peptidoglicano guardan relación con esta resistencia (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

II.5.3. Resistencia a las Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas tienen como “blanco”, en *S. aureus*, a la topoisomerasa IV que es una enzima esencial necesaria para la decatenación o interunión de cromosomas. Además una girasa relacionada (*gyrA*, *gyrB*) altera el ADN (ácido desoxirribonucleico) y dificulta la replicación (McCallun *et al.*, 2010). En bajas concentraciones las fluoroquinolonas son mutagénicas y aumentan el ratio de mutación bacteriana. Es importante el hecho de que concentraciones subinhibidoras de fluoroquinolonas aumentan la resistencia a β -lactámicos (Tattevin *et al.*, 2009).

El principal modo de resistencia a fluoroquinolonas son las mutaciones del *grlAB* y *gyrB*. El segundo modo de resistencia es el aumento del eflujo del antibiótico por la familia *Nor* de bombas de eflujo de diferentes medicamentos.

Algunos de estos, como el *NorA* no solo inducen resistencia a la norfloxacin, sino que también la produce frente a β -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y otros compuestos químicos. Esto mismo puede ocurrir con otros miembros de la familia (Mesak *et al.*, 2008).

II.5.4. Resistencia a Tetraciclinas

Las tetraciclinas, su mecanismo de acción comienza, cuando atraviesan la membrana externa de las bacterias a través de porinas por difusión pasiva, llegando al citoplasma gracias a un mecanismo dependiente de energía. En el interior del citoplasma se unen al ribosoma inhibiendo la síntesis de las proteínas. Este efecto se produce evitando la unión del sitio aminoacil del ácido ribonucleico (ARN) de transferencia (aminoacil ARN-*transfer*) a la subunidad 30S ribosomal. La asociación es reversible, lo cual explicaría su efecto bacteriostático (Sopena, 2001; Oliver, 2012)

La resistencia puede ser natural o adquirida y debida a diferentes mecanismos (Pérez *et al.*, 1998; Rodríguez-Baño *et al.*, 2006). La disminución en la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (eflujo) puede conferir resistencia a las tetraciclinas de forma natural o adquirida. Otro mecanismo frecuentemente involucrado en la resistencia adquirida se debe a proteínas de protección ribosomal que permiten activar al aminoacil ARN-*transfer* en presencia de concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de éstas. Tanto el bombeo activo como la protección de la inhibición del ribosoma son mecanismos de resistencia que suelen estar relacionados con la adquisición de elementos móviles (plásmidos, transposones o integrones) de resistencia (Levy *et al.*, 1999). Ambos mecanismos pueden ser inducidos por bajas concentraciones de tetraciclina (Trzcinski *et al.*, 2000; Connell *et al.*, 2003)

II.5.5. Resistencia a Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos de amplio espectro (McCallum *et al.*, 2010), aumentan el ratio de error de la síntesis de proteínas en el ribosoma, provocando errores en la lectura y/o dificultando el paso de translocación. El resultado es la alteración de la pared de la bacteria por la incorporación de

proteínas defectuosas. En una segunda fase, esto favorecerá el aumento de la entrada del antibiótico en la bacteria (Vakulenko y Mobasthery, 2003). Todos los aminoglicósidos se unen selectivamente a la subunidad ribosomal 30S, pero las interacciones de cada uno de ellos es diferente. (Oliver, 2012)

En el 2001, Sopena describió que la resistencia puede deberse a tres mecanismos:

1) Modificación estructural de las proteínas diana ribosómicas, por mutaciones de los genes que las codifican. Es una resistencia de tipo cromosómico y habitualmente de alto nivel de expresión, que afecta principalmente a la estreptomicina.

2) Alteración de la permeabilidad a los aminoglucósidos por mutaciones que afectan al sistema de transporte dependiente de energía. Este mecanismo es poco frecuente en *S. aureus* y produce una resistencia de bajo nivel a todos los aminoglucósidos.

3) Modificación enzimática del agente antimicrobiano, que es el mecanismo de resistencia habitual de *S.aureus* y los gramnegativos a la mayoría de los aminoglucósidos.

La modificación enzimática, se produce durante el transporte del aminoglicósido a través de la membrana citoplasmática. Este mecanismo, depende de cada aminoglucósido y enzima. El compuesto resultante no se transporta adecuadamente al interior de la bacteria o no se une al ribosoma. Finalmente, se conocen diversas enzimas modificadoras (fosfotransferasas, nucleotidiltransferasas), que pueden actuar sobre varios aminoglucósidos (Sopena, 2001).

El mecanismo de resistencia de modificación enzimática puede estar codificado a nivel plasmídico o cromosómico. En general, la resistencia cromosómica suele ser de alto nivel, a diferencia de la plasmídica. Asimismo, existe resistencia a la gentamicina, tobramicina y kanamicina, y más esporádicamente a y amikacina (Sopena, 2001).

II.6. Técnicas para Detección de Resistencia Bacteriana

II.6.1. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana es un método eficaz para detectar los aislamientos de *S.aureus* con susceptibilidad disminuida a la penicilina (SDP). Esta prueba es recomendada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). La prueba necesita el empleo de un disco de oxacilina (1µg). Finalmente, de acuerdo con los criterios de interpretación recomendados por la CLSI, los aislamientos que presentan halos ≤ 10 mm son resistentes a los antibióticos β -lactámicos. Estudios realizados en Trinidad y Tobago, determinaron que esta prueba cuenta con una sensibilidad de 98% y una especificidad de 99% para la detección de resistencia a meticilina en *S. aureus* (Ovalle *et al.*, 2001).

Interpretación de los Resultados

Estándares de Interpretación de Zonas de Diámetro

Existen tablas específicas del CLSI, que indican los criterios para interpretar los diámetros de zonas para categorizar exactamente niveles de susceptibilidad de los microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos (Sopena, 2001).

Categorías Interpretativas

- **Sensible**

La categoría "sensible" implica que una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante (Sopena, 2001).

- **Intermedio**

La categoría "Intermedio" incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) que se aproximan usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedio" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y betalactámicos en orina) o cuando una

dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada (por ej. betalactámicos) (Sopena, 2001).

- **Resistente**

Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CMI que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. betalactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados (Sopena, 2001).

II.6.2. Prueba de Látex Aglutinación (PBP2a)

Es una prueba rápida de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos monoclonales dirigidos hacia las proteínas modificadas bacterianas (PBP2a) presentes en SARM. La prueba permite la detección indirecta de SARM poniendo de manifiesto a la proteína PBP2a. Su uso facilita el reconocimiento de SARM, en pocos minutos, debido a que existe una reacción de aglutinación a simple vista (Ulloa *et al.*, 2001; Salvador *et al.*, 2005).

Estudios realizados en Trinidad y Tobago determinaron que no existe diferencia en cuanto a sensibilidad (100%) y especificidad (100%) para la detección del gen *mecA* por medio de técnicas como PCR y Látex Aglutinación; además se determinó que esta última detectó con mayor rapidez SARM, ofreciendo así un resultado confiable, rápido y altamente costo-efectivo (Akpaka *et al.*, 2008).

II.6.3. Reacción de la Polimerasa en Cadena

La prueba de reacción de la polimerasa en cadena, fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Esta prueba es conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction). La prueba de PCR, permite producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN(ácido desoxirribonucleico)específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN (AMGEN, 2010).

La prueba de PCR, como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa. La enzima ADN polimerasa es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Para esta prueba se necesita que existan nucleótidos

en el medio, que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se desea copiar para que sirva como cebadora (AMGEN, 2010).

El PCR se desarrolla en tres pasos los cuales han sido descritos por AMGEN (2010)

1) Desnaturalización, es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar. Se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.

2) Hibridación, para este paso se debe bajar la temperatura para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

3) Extensión, consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa.

EL PCR es un método rápido y eficaz, considerado como “gold standart” para la detección gen *mec A* (Salvador *et al.*, 2005).

II.7. Evolución de la resistencia antibiótica en *S. aureus*

S. aureus fue el primer microorganismo en poner de manifiesto la resistencia a los antimicrobianos, en el año 1944 se introdujo de forma terapéutica la penicilina para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Dos años después, se informó del primer *S. aureus* con resistencia a penicilina, debido a la producción de un tipo de β -lactamasas (penicilinasas) que hidroliza el anillo β -lactámico de la Penicilina (Barber, 1947).

Durante la década de los años 1950, se fueron introduciendo en la práctica clínica nuevos antibióticos, debido al incremento de la resistencia adquirida hacia los antibióticos conocidos. Así, en 1957, muchas cepas de *S. aureus* presentaban resistencia múltiple a penicilina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina (Shanson, 1981).

En 1959 se apareció la meticilina, una penicilina semisintética que resiste la acción de la β -lactamasa que degrada la penicilina. Ésta nueva droga permitió volver a tener un

control sobre las infecciones por *S. aureus* (Barret, 1968). En 1961 aparecen las primeras cepas resistentes a meticilina aisladas en Inglaterra por Jevons y Knox (Jevons, Knox, 1961). Dos años después aparece el primer brote epidémico de infección nosocomial por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en el Reino Unido (Stewart, 1963). Estos aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina presentan resistencia intrínseca a todos los β -lactámicos, incluidas las cefalosporinas y carbapenemes.

La resistencia de *S. aureus* a aminoglucósidos parece estar relacionada en su inicio con el uso tópico. Los primeros aislamientos resistentes a este grupo de antibióticos se detectaron en 1959 en Estados Unidos y es en los años 70 cuando aparecen los primeros casos en Europa (Crossley, 1979).

A finales de los años 80 se encuentran cepas de *S. aureus*, que además de la resistencia a los β -lactámicos del grupo de las penicilinas, especialmente a penicilinas semisintéticas como la meticilina y la oxacilina (SARM), se observan cepas multiresistentes (MDR) para grupos de antibióticos como macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y lincosamidas que son una alternativa al tratamiento con clindamicina, mupirocina o ácido fusídico y sobre todo con vancomicina (Appelbaum, 2007).

En la última década se han documentado casos de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a glucopéptidos (Hiramatsu, 1997) y recientemente se han descrito casos en Estados Unidos de cepas de *S. aureus* con resistencia de alto nivel a vancomicina (CDC, 2002; Chang, 2003; CDC, 2004; Tenover, 2004). La emergencia de SARM resistente a vancomicina es preocupante ya que la vancomicina es el tratamiento alternativo de las cepas SARM en la especie humana. Desde 1996 (CDC, 1997) se ha ido informando de cepas con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA) y resistentes (VRSA) en Europa, Asia y EEUU (Tenover, 2010).

II.8. Importancia en Salud Pública Veterinaria

II.8.1. Uso de Promotores de Crecimiento en Producción Animal

El término “promotores de crecimiento” (PC) es usado para aditivos alimentarios, a fin de favorecerla tasa de crecimiento, y/o mejorar la eficiencia de conversión en animales de producción, alimentados con una dieta balanceada(Committee on Drug Use

in Food Animals Panel on Animal Health, Food Safety, and Public Health, 1998; Gesche y Emilfork, 1998; Van den Boggard y Stobberingh, 1999).

Durante las últimas etapas de la segunda guerra mundial se autorizó la utilización de la penicilina a los médicos veterinarios. Tras culminar la guerra, se reportó que la estreptomicina, administrado en la dieta de pollos, mejoraba su tasa de crecimiento. Asimismo, otros agentes antimicrobianos utilizados demostraron tener efectos similares en la performance de las aves y otros animales de producción (Gustafson y Bowen, 1997).

La suplementación de antibióticos como promotores de crecimiento coincidió con el desarrollo de la crianza por confinamiento de un gran número de animales para consumo, que se expandió entre 1950 y 1960.

Finalmente, el frecuente uso de agentes antimicrobianos en la dieta animal, trajo como consecuencia el desarrollo y la diseminación de bacterias resistentes en animales y humanos (Gustafson y Bowen, 1997; Collignon, 2003).

II.8.2. Uso de Promotores de Crecimiento en Granjas Porcinas

La introducción de los PC en la porcicultura resultó ser eficiente y efectiva para mejorar sus tasas de crecimiento. Asimismo, se ha demostrado que los PC prevenían enfermedades endémicas en grandes grupos de animales; particularmente animales jóvenes, destetados y los expuestos a algún otro tipo de estrés (Gustafson y Bowen, 1997).

Existen diversos promotores de crecimiento en la actualidad, como por ejemplo: bacitracina, clortetraciclina, eritromicina, penicilina, tiamulina, tilosina y virginiamicina (Gustafson y Bowen, 1997).

II.9. Importancia de los SARM en la especie humana

Los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM), en la especie humana, son uno de los patógenos nosocomiales más importantes. Se trata de un patógeno virulento, capaz por sí solo de aumentar la incidencia global de infección estafilocócica (Coia *et al.*, 2006). Las infecciones causadas por SARM se asocian con una mayor mortalidad y coste económico que las causadas por *S. aureus* sensibles (Cosgrove *et al.*, 2003; Cosgrove and Carmeli, 2003).

II.9.1. Modos de adquisición de la infección por SARM: SARM-AH/SARM-AC/SARM-AL

Debido a sus características epidemiológicas se ha clasificado en distintas categorías, SARM asociada a hospitales (SARM-AH), SARM asociada a la comunidad (SARM-AC) y SARM asociada a la ganadería (SARM-AL) (Armand-Lefevreet *et al.*, 2005).

II.9.1.1. SARM asociada a hospitales (SARM-AH):

S.aureus resistente a meticilina ha sido considerado como el prototipo de los patógenos nosocomiales resistentes a múltiples fármacos, que causa infecciones en los hospitales y centros de salud. (Diekema *et al.*,2001).

Estas infecciones de SARM se conocen desde hace décadas. Se considera como SARM-AH, cuando las infecciones causadas por estos microorganismos se adquirieren en el hospital y surgen por lo menos 48 horas después del ingreso de los pacientes, además tienen factores de riesgo particulares tales como: la estancia prolongada en el hospital, la atención en unidades de cuidados intensivos (UCI), el tratamiento prolongado con antibióticos, las intervenciones quirúrgicas, y / o el estrecho contacto con personas SARM-positivas (EMEA, 2009; Stefani *et al.*, 2012).

SARM-AH se ha convertido en endémica en los países industrializados como causa de infecciones graves como la septicemia, la neumonía, la neumonía asociada a la ventilación y del sitio quirúrgico infecciones (Diekema *et al.*,2001).En los EE.UU., el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNISS) informó que en 2003, más del 60% de *S.aureus* aislados en la UCI fueron SARM (Klevens *et al.*,2006).En Europa, según datos recogidos por Antimicrobial Resistance Interactive Database (EARS-Net), la tasa de SARM en infecciones del torrente sanguíneo varía desde menos del 1% a más del 50% en los diferentes países, con tasas más bajas en los países del norte de Europa y una tasa más alta en los países mediterráneos (Kock *et al.* ,2010).

II.9.1.2. SARM asociada a la comunidad (SARM-AC)

Al final de la década de 1990, una nueva generación de SARM apareció en un entorno diferente, la comunidad.SARM adquirida en la comunidad, muestra una

virulencia y capacidad inusual para difundirse, siendo capaz de causar infecciones en individuos jóvenes y sanos (Deleo *et al.*,2010).

SARM-AC causa diferentes grados de gravedad, desde leves como forúnculos o impétigo hasta infecciones graves como fascitis necrotizante (Miller *et al.*,2005), y rara vez puede causar una forma grave de neumonía (neumonía necrotizante) este tipo de infección se asocia con una alta mortalidad (Francis *et al.*,2005).

II.9.1.3. SARM asociado a la ganadería (SARM-AL)

Recientemente, SARM surgió como un colonizador frecuente de las poblaciones animales, posiblemente favorecido por el extenso uso de antibióticos en los animales de producción, sobre todo en el ganado porcino. Una nueva cepa de SARM con potencial zoonótico ha sido reconocido como SARM asociado al ganado (SARM-AL) (Pantosti, 2012)

Durante el período 1970-2000, SARM se ha aislado de animales, de forma esporádica, en vacas, animales de compañía y caballos (Leonard y Markey, 2008).

Hasta finales del siglo XX, tanto la comunidad científica como los responsables políticos pensaban que SARM no estaba relacionado con la cría de animales, sino que se trataba de un problema basado únicamente en el uso de antimicrobianos en medicina humana (Oliver, 2012).La situación ha cambiado, con un aumento del número de informes de SARM-AL.

II.9.2. Diferencias entre SARM-AC y SARM -AH:

- El SARM-AC afecta generalmente a niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo (Borraz, 2005)
- Hasta el momento los aislamientos de SARM descritos en pacientes de la comunidad se caracterizan por presentar rara multirresistencia (Naimi *et al.*, 2003) y generalmente sólo son resistentes a β -lactámicos, con una CMI a oxacilina baja; a diferencia de los aislamientos hospitalarios de SARM que presentan resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos no relacionados (Borraz, 2005).
- Las cepas de SARM-AC parece ser que crecen más rápido *in vitro* (Okuma, 2002) y llevan genes de virulencia adicionales (Baba, 2002).

- Los aislamientos de SARM-AC se caracterizan por poseer el SCCmec tipo IV o en menor frecuencia el tipo V (Ito, 2004), y los genes de la toxina LPV (Vandenesch, 2003). Mientras las cepas SARM de origen hospitalario poseen el SCCmec tipo II o III y en algún caso también se ha aislado la LPV (Saiman, 2003).
- Característicamente, la gran mayoría de SARM-AC alberga los genes para la leucocidina Pantón-Valentine (LPV), una toxina que está ausente en SARM-AH (Vandenesch *et al.*, 2003). PVL ha sido considerado como el principal determinante de virulencia (Lina *et al.*, 1999, Boyle-Vavra y Daum, 2007) o un simple marcador de cepas SARM-AC (Voyich *et al.*, 2006).

II.10. Implicaciones zoonóticas

II.10.1 SARM en animales

Las personas en contacto directo con animales SARM-positivos, tienen un mayor riesgo de llevar las mismas cepas de SARM que ellos. Esto se ha documentado en hospitales veterinarios de pequeños animales, animales de producción y centros de salud (Morgan, 2008; Weese, 2008). Este fenómeno emergente, representa un peligro que exige un enfoque de gestión bilateral, teniendo en cuenta a los animales y a los seres humanos como fuentes potenciales de SARM.

SARM se ha aislado en casi todas las especies domésticas, perros, gatos, ganado vacuno, ovino, porcino y aviar. También se ha descrito la transmisión entre humanos y animales (Leonard y Markey, 2008). A veces son linajes genotípicos específicos que circulan entre las especies animales, (Cuny *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2005), pero en muchas ocasiones están asociados a linajes genotípicos de origen humano (Weese, 2008).

II.10.2. SARM en porcinos

El primer caso donde se identificó el contacto con ganado porcino como factor de riesgo para la infección por SARM, fue en Holanda en el año 2004, donde una bebé y sus padres, que vivían en una granja de cerdos se encontraron colonizados por esta bacteria resistente (Voss *et al.*, 2005). Al año siguiente, la crianza de cerdos fue

considerada como factor de riesgo para ser portadores de *S. aureus* a nivel nasal. Para los años 2005 y 2006, estudios realizados en el mismo país, documentaron prevalencias de SARM en granjas porcinas que varían entre el 23% y 81% (De Neeling *et al.*, 2007; Van Den Broek *et al.*, 2009; Wulf *et al* 2008).

Estudios posteriores demostraron que la presencia del SARM “asociada a porcinos” en Holanda y Francia no era un hecho excepcional, ya que este clon se recuperó de porcinos en varios países europeos (Guardabassi *et al.*,2007; Vanderhaeghen *et al.*,2010b). Se encontró que el SARM porcino pertenece a un único clon de SARM, ST398.

II.10.2.1 SARM-AL ST398

SARM ST398 fue identificado a través de uno de sus clones por medio de secuencia tipificada multilocus (MLST). La cepa ST 398, es considerada por varios científicos como una cepa de gran riesgo zoonótico, ya que tanto personal de granjas, médicos veterinarios y personas de la comunidad pueden colonizarse o infectarse con cepas de SARM (Van Belkum *et al.*, 2008; Khanna *et al.*, 2008).

SARM-AL ST398 es generalmente susceptible a los antibióticos distintos de β -lactámicos, pero es característicamente resistente a la tetraciclina, lo que sugiere que el uso de tetraciclina en la industria porcina puede haber favorecido la aparición de este clon. Un estudio reciente mostró que la adición de tetraciclina en la alimentación animal incremento el número de células bacterianas ST398 en las fosas nasales de los porcinos (Moodley *et al.*, 2011)

Característicamente las cepas SARM-AL ST398 llevan SCCmec de tipo IV o, más frecuentemente, de tipo V (Monecke *et al.*,2011).característica que comparte con SARM-AC y sugiere una transmisión de elementos genéticos entre estos dos grupos de SARM.Sin embargo, a diferencia de SARM-AC, ST398 generalmente no posee los genes codificados para PVL, que contribuyen a la virulencia de SARM-AC (Van Belkum *et al.*,2008; Welinder-Olsson *et al.*,2008).

SARM ST398 además de la especie porcina, puede colonizar otras especies de ganado, por lo que se le ha designado como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociada a la ganadería(SARM-AL). Las tasas de transporte denunciados de

SARM-AL ST398 en cerdos varían según la zona geográfica y el tipo de estudio: La European Food Safety Authority (EFSA), intentó determinar la prevalencia de la cepa ST398 en los cerdos, para lo cual realizó un estudio multinacional donde se encontró una prevalencia de 25,5% de MRSA ST398, en granjas de cerdos, la cual varía de 0% al 50,2% entre los estados miembros de la Unión Europea (EFSA, 2009). En Ontario, Canadá, un estudio encontró que el 25% de los cerdos procedentes de 20 granjas fueron colonizados con SARM y que el tipo predominante era la secuencia ST398 (Khanna. *et al*, 2008). En otro estudio realizado en los EE.UU. examinaron 299 animales de los dos sistemas de producción de cerdos, en Iowa e Illinois, y el 45% se encontró que portaban SARM. Todos los aislamientos fueron descritos como ST398 (Smith *et al*, 2009). En la actualidad, la adquisición de SARM ha ido incrementando en las personas. Esto último reportado en base a estudios de control realizados en veterinarios y personal de granjas porcinas (Khanna *et al.*, 2008).

A pesar de la alta tasa de colonización en los cerdos por SARM-AL ST398 solo se ha reportado de manera esporádica, que cause infecciones clínicas en esta especie animal (Weese, 2010). Donde la infección por estafilococos más común, en esta especie, es la causada por *S. hyicus*.

Últimamente se ha identificado a la contaminación por SARM de alimento de origen animal como una gran amenaza, ya que tiene como potencial una amplia difusión en la población en general (Kluytmans, 2010). Un estudio realizado en los Países Bajos (Holanda) se encontró que el 11% de las muestras de carne cruda en el mercado minorista (incluyendo carne de cerdo, carne de res, ternera, cordero y pollo) estaba contaminado por SARM, representada principalmente por SARM ST398 (De Boer *et al*, 2009). Otro estudio realizado en el sur de Italia informó de la presencia de SARM correspondientes a ST398 en productos de queso mozzarella (Crisetti *et al.*, 2011).

II.11. SARM-AL ST398 y las infecciones en los seres humanos

Después del primer informe de los Países Bajos (Holanda), muchos estudios de Europa y otras zonas indicaron que vivir o trabajar en una granja porcina era un factor de riesgo para la adquisición de SARM. Un estudio de casos y controles realizado en los Países Bajos mostró que los portadores no tipificables de SARM eran más a menudo los

cerdo o los ganaderos y que la densidad de SARM no tipificables aislados correspondían a la densidad de la cría de cerdos (Van Loo *et al.*, 2007). Estudios realizados en Bélgica, el 37,8% de los criadores de cerdos se encontraron colonizada por SARM-ST398 (Denis *et al.*, 2009), en Alemania fueron colonizadas el 86% de los productores de porcino y el 45% de los veterinarios que se encargan de los porcinos (Cuny *et al.*, 2009). Mientras que los miembros de la familia que no fueron expuestos directamente a los porcinos fueron colonizados en un porcentaje inferior (Cuny *et al.*, 2009), lo que indica que la transmisión interhumana puede ocurrir, pero a baja frecuencia. En otro estudio (Wulf *et al.*, 2008b) doscientos setenta y dos participantes a una conferencia internacional sobre salud de ganado porcino en Dinamarca fueron muestreados para SARM (fosas nasales y faringe) y dió como resultado que treinta y cuatro participantes (12.5%) de 9 países, portaban SARM. La mayoría de las cepas pertenecían al ST398. Por lo que se deduce que la transmisión de SARM a partir del ganado porcino es un problema internacional. El riesgo ocupacional para la colonización de SARM-AL a través del contacto con ganado porcino también se ha demostrado en Bélgica (Denis *et al.*, 2008), Alemania (Meemken *et al.*, 2008), Dinamarca (Wulf *et al.*, 2008b) y España (Lozano *et al.*, 2011).

II.12. Prevalencia en el Perú

Arriola C. el año 2009, demostró la presencia de SARM en un 5% (1/20) de porcinos criados a traspaso de 6 comunidades evaluadas en el departamento de Tumbes. Otros estudios realizados en granjas porcinas tecnificadas de Lima realizados por Changanaki en el año 2010 y Güere en el 2013 hallaron una prevalencia del 17% (3/120) y 6.67% (8/120) respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Materiales

Para la parte experimental del proyecto se emplearon los siguientes materiales: 325 hisopos EUROTUBO (*Deltalab, Barcelona, España*) modelo 300295/medio de transporte Stuart, 5000 ml de agar manitol salado, 5 ml de cefoxitina, 6000 ml de agar soya tripticasa, 300 ml de sangre estéril de ovino, 300 ml de plasma de conejo, 1000 ml de caldo soya tripticasa, 500 ml de caldo cerebro-corazón, 200 ml de glicerol al 85%, cepas control ATCC 43300 (control positivo) y ATCC 29213 (control negativo).

III.2 Método experimental

III.2.1 Lugar de ejecución

La colección de muestras de hisopado nasal se realizó a 325 porcinos de crianza de traspatio, previo a su sacrificio, en un camal del departamento de Tumbes. Las muestras recolectadas fueron trasladadas y procesadas en la Sección de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina - Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) ubicada en Lima – Perú.

III.2.2 Animales

En el presente estudio, para el cálculo del tamaño muestral se empleó la fórmula de prevalencia límite. Esta fórmula se emplea cuando se ha podido identificar un valor de prevalencia debajo del cual la presencia de la enfermedad es irrelevante. Vale decir, esta optimizada para que de existir la condición, exista una probabilidad de diagnosticar al menos un animal con la enfermedad con una probabilidad igual al valor de confianza. En nuestro caso, se estableció una prevalencia límite del 1%. Por tanto, se podría identificar al menos un porcino portador de una cepa SARM con una confianza del 95%. La fórmula y los valores fueron:

$$n = \frac{\log(\text{confianza})}{\log(1 - p)}$$

Dónde:

n = Tamaño muestral

Confianza = Valor de z (distribución normal) de detectar la condición (1.96 para 0.975)

p = Prevalencia límite

Sustituyendo para una prevalencia límite de 1% y una confianza del 95% se necesita muestrear al menos 298 cerdos (González, 1987).

III.2.3 Toma de muestra

La toma de muestra se realizó entre setiembre y octubre del 2011. Por cada animal se utilizó un hisopo estéril, el cual se rotó alrededor de la membrana mucosa de ambas narinas. Las muestras fueron debidamente rotuladas con fecha y código de muestra. Asimismo, las muestras de hisopado nasal se mantuvieron en medio de transporte Stuart 300295 (Eurotubo ®) para asegurar su viabilidad hasta su debido procesamiento. Finalmente, fueron trasladadas al laboratorio en un cooler a una temperatura aproximada de 4°C. En el laboratorio las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento (Khanna *et al.*, 2008; Pineda, 2008).

III.2.4 Procesamiento de muestras

III.2.4.1. Cultivo de Muestras en Agar selectivo Manitol Sal cefoxitina (MAS-Cef)

En el laboratorio, de manera estéril se hizo la siembra en agar selectivo manitol sal cefoxitina 4µg/ml. Cada una de las muestras de hisopado nasal fue sembrada a manera de estrías, cubriendo toda la superficie del agar, en tres ángulos distintos y girando el hisopo. A continuación las placas fueron llevadas a incubación a 37°C por 48 horas. Se realizó la lectura de las placas a las 24 y 48 horas post-sembrado, terminada la última evaluación, se procedió a la selección del 10% de las unidades formadoras de colonias (UFC) compatibles con *Staphylococcus aureus* considerando un máximo de 100 colonias por placa. Las UFC seleccionadas eran colonias redondeadas, elevadas, de superficie lisa y brillante, consistencia variable, de márgenes definidos, de color blanco amarillento, incluso anaranjado y que hayan producido el viraje del color característico del agar manitol salado (rosado) hacia amarillo. Esto último, indicó la presencia de colonias fermentadoras del componente manitol, característica propia del género *Staphylococcus spp.* (Salvador *et al.*, 2005).

III.2.4.2. Subcultivo de Colonias del género *Staphylococcus spp.* a Agar Sangre

Se realizó un subcultivo de las UFC seleccionadas, en placas con agar sangre 5%, con el fin de verificar las características fenotípicas de *Staphylococcus aureus* en las colonias. Las placas con agar sangre ya sembradas fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Finalmente, tras 24 horas se procedió a la visualización de las características fenotípicas (colonias doradas de superficie lisa, bordes netos y brillantes, beta hemólisis, etc) (Salvador *et al.*, 2005)

III.2.4.3. Enriquecimiento en caldo cerebro corazón (BHI)

Se realizó el enriquecimiento de las UFC fenotípicamente similares *Staphylococcus aureus*. Para ello se inoculó de 2-3 UFC en tubos falcon estériles de 15 ml que contenían 4 ml de caldo cerebro corazón, realizada la inoculación se incubaron a 37°C por 24 horas.

III.2.4 4. Prueba de Coagulasa

Se colocó 0.3 ml de plasma de conejo en un tubo de ensayo, en el cual se añadió 0.1 ml del caldo BHI inoculado el día anterior, se dejó en incubación a 37°C por 4 horas, pasado este tiempo se realizó la primera lectura (visualización de formación de coágulo). Inmediatamente después, se volvió a incubar a 37°C hasta completar las 24 horas; procediéndose a realizar la segunda lectura. Finalmente, la formación de un coágulo bien definido se consideró como una reacción positiva a la presencia de la enzima coagulasa (Díaz y Ferrán, 2004).

III.2.4.5. Almacenamiento de muestras

Los aislamientos que dieron como positivas a la prueba de coagulasa, fueron inoculadas en caldo tripticasa soya, para la inoculación se colocó de 2 a 3 colonias en tubos de vidrio de 15 ml que contenían 4 ml de caldo tripticasa soya a continuación se llevaron a estufa a 37°C por 24 horas. A continuación se colocó en crioviales, rotulados, 1 ml del caldo bacteriano más 0.5 ml de glicerol al 85%. Se almacenaron 2 juegos de cada cepa a -80°C.

III.2.5. Identificación genotípica de SARM

La identificación de los aislamientos se determinaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes *16S* (proteína bacteriana), *nuc* (termonucleasa específica de *S. aureus*) y *mec A* (resistencia a meticilina). La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó de la siguiente manera: se suspendió un ansa llena de colonias en 1000 µl de buffer fosfato salino (PBS) se homogenizó y centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, y se adicionó 100 µl de buffer TE. Esta solución se calentó a 95 °C por 10 minutos y seguidamente se colocó en hielo por 10 minutos. La suspensión se diluyó en 900 µl de buffer TE y fue almacenada a -20 °C hasta su procesamiento.

El PCR se realizó en un Gene Amp ® PCR System 9700 (AB Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo los siguientes programas para *16S*, *nuc* y *mec A*: 94°C

x 5 min/ 30 ciclos (94°C x 30 sec, 55 °C x 30 sec, 72 °C x 30 sec)/ 72 °C x 7 min, 94°C x 5 min/ 30 ciclos (94°C x 30 sec, 52 °C x 30 sec, 72 °C x 30 sec)/ 72 °C x 7 min y 94°C x 5 min/ 30 ciclos (94°C x 30 sec, 50 °C x 30 sec, 72 °C x 30 sec)/ 72 °C x 7 min, respectivamente.

III.2.6. Análisis de Datos

El cálculo de la prevalencia y los intervalos de confianza se realizó empleando simulaciones basadas en la distribución Beta (α, β), donde α = número de éxitos + 1 y β = número de fracasos + 1. La simulación se desarrolló utilizando el paquete comercial @Risk (Palisade Corp.) implementado en una planilla electrónica Excel ® (Microsoft Corp.). La simulación se corrió con 30,000 repeticiones y el nivel de significancia fue de 0.05.

IV. RESULTADOS

Ninguna de las muestras de hisopados nasales de porcinos de crianza de traspatio fue SARM positiva.

El estudio evaluó a 325 porcinos, y se tomó una muestra de ambas narinas por cada animal. Tras la siembra en Agar Manitol Sal Cefoxitina 4µg/ml (MAS-Cef), 212 muestras presentaron UFC fermentadoras de manitol y resistentes a cefoxitina. A continuación se seleccionó el 10 % (1244) del total de colonias. Posteriormente estas UFC fueron resembradas en placas con agar sangre, de las cuales 729 UFC fueron compatibles morfológicamente con *Staphylococcus aureus*, correspondiente a 212 animales, de las cuales 79 muestras fueron positivas, a la prueba de coagulasa en tubo (Cuadro 4 y 5). Posteriormente al realizarla prueba de PCR no se halló el gen *nuc* (termonucleasa específica de *S. aureus*), pero sí la presencia del gen *mecA* (gen asociado a la resistencia a meticilina), en 15 de las 79 muestras coagulasa positivas (Cuadro 6).

Cuadro 4: Número de muestras procesadas.

MÉTODO	MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS NEGATIVAS	TOTAL DE MUESTRAS
Siembra MAS-Cef	212	113	325
Subsiembra Agar Sangre	212	0	212
Prueba de Coagulasa	79	133	212

Cuadro 5: Prevalencia de *Staphylococcus spp.* encontrados durante el proceso de aislamiento.

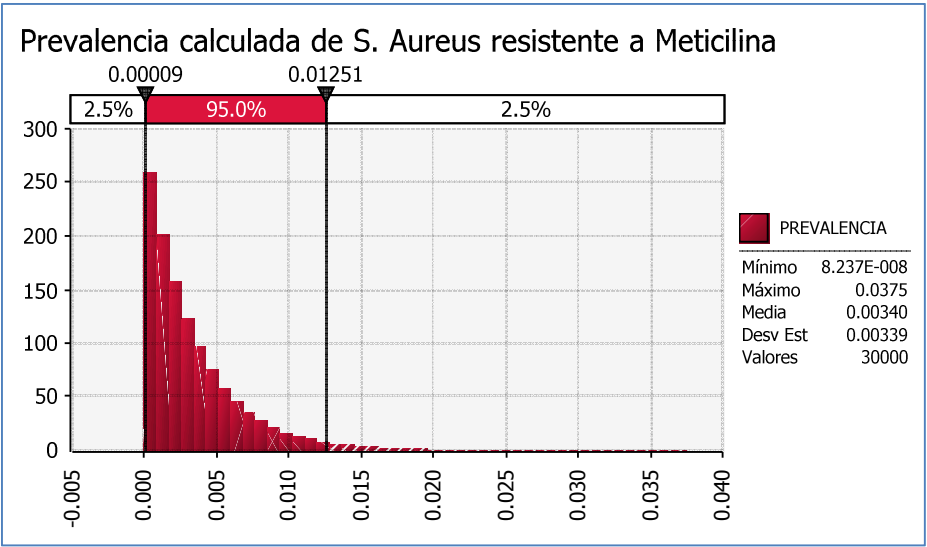
PROCEDIMIENTO	PREVALENCIA	MÍNIMO	MÁXIMO
Siembra MAS-Cef	0.651	0.536	0.753
Subsiembra Agar Sangre	0.9953	0.98603	0.99976
Prueba de Coagulasa	0.374	0.3103	0.4395

La probabilidad de hallar un cerdo con SARM se encontraba en el intervalo de confianza del 95% desde 0.00009 (0%) a 0.01251 (1%). Consecuentemente, se estaba muy por debajo de la prevalencia límite.

La prevalencia hallada fue de 0.00339 (0%) con intervalos de confianza que van de 0.00009 a 0.01251 (Gráfica 1).

Al analizar la presencia del gen *mecA* se encontró que 15 colonias tenían el gen *mec A*. La prevalencia del gen *mec A* fue de 0.0544 (5%) con un intervalo de confianza del 95% que iba desde 0.0315 (3%) a 0.0830 (8%) (Gráfica 2).

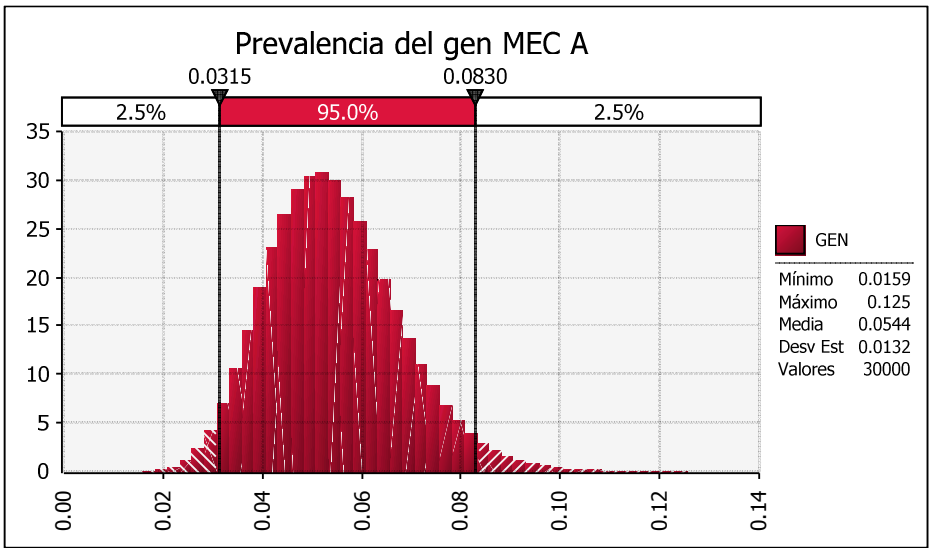
Figura 2.Muestra gráficamente los resultados de la simulación. Prevalencia calculada de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.



Cuadro6: Resultados de la prueba de PCR de las 79 muestras positivas a la prueba de coagulasa en tubo.

Prueba PCR	Gen 16S	Gen Nuc	Gen MecA
	79	0	15

Figura 3.Muestra gráficamente los resultados de la simulación. Prevalencia del gen *mec A* en porcinos de crianza de traspatio en la provincia de Tumbes.



V. DISCUSIÓN

El presente estudio planteo la hipótesis que *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina está presente en la crianza porcina de traspatio del departamento de Tumbes, Perú. En este sentido los resultados hallados, dieron como negativa la presencia de SARM, sin embargo se hallaron otras especies resistentes a meticilina del género *Staphylococcus spp.* y en ellas se detectó el gen *mecA*, responsable de la resistencia lo que nos permite tener en consideración la capacidad de transmisión de este gen.

No se puede afirmar que el departamento de Tumbes esté libre de SARM, ya que Arriola en el 2011, reportó que el 5% (1/20) de porcinos de 1/6 comunidades de Tumbes era positivo a SARM. Si bien la ausencia de cepas de SARM en este trabajo discrepa con el estudio realizado en Tumbes, pone en evidencia la presencia de otros *Staphylococcus* resistentes a meticilina.

Como muchos autores a nivel mundial, en el presente estudio se usó métodos selectivos y diferenciales para el aislamiento de SARM, debido a que previenen el crecimiento de *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina (SASM) (Van Enk y Thompson, 1992; European Food Safety Authority, 2009). Para el aislamiento de SARM se utilizó como medio de cultivo el agar manitol sal cefoxitina, un agar con alta concentración de sal e indicador de pH rojo fenol, al cual se le adicionó cefoxitina, este agar fue desarrollado para el aislamiento presuntivo de *S. aureus* (coagulasa positivo). Sin embargo los resultados finales demuestran que hubo el crecimiento de

Staphylococcus coagulasa negativos pero Manitol positivos corroborando lo reportado por Kawamura *et al.* en el año 1998 y Shittu *et al* en el año 2006 en muestras nasales y clínicas en Japón y Nigeria respectivamente.

Para detectar SARM también se realizó la prueba de coagulasa en tubo, donde se obtuvo 79 muestras coagulasa positivas, a las cuales se les realizó la prueba de PCR, dando resultado que ninguna de ellas era *Staphylococcus aureus*, por lo que podrían ser otras cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos, así como la detección de falsos positivos debido a que algunos estafilococos de origen animal no presentan el factor de aglutinación, sin embargo son positivos a la prueba de coagulasa en tubo, como lo mencionó Koneman en 1997.

Tras la prueba de PCR, no se encontró el gen *nuc* propio de *Staphylococcus aureus*, pero se halló el gen *mecA*, lo que corrobora lo hallado por Beck en 1986 y Berger-Bächi en 1994 donde mencionan que el gen *mecA* se encuentra distribuido, de forma amplia, tanto entre *S. aureus* como entre otras especies de estafilococos coagulasa-negativos resistentes a meticilina (Wielders, 2001).

Otro estudio realizado en Japón por Susuki *et al.*, 1992, reportó que de 125 cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes a meticilina aisladas en humanos, 96,8% de las cepas (121/125) que pertenecían a las nueve especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativos (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warneri* y *S. caprae*) llevaron en su genoma el gen *mecA*, lo que indica la amplia distribución de genes entre especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativos.

Los resultados obtenidos nos brindan un alcance sobre la presencia de bacterias resistentes a meticilina, que cuentan con el gen *mecA* causante de resistencia en *Staphylococcus aureus*. La importancia del presente estudio se debe al hallazgo de *Staphylococcus* spp. que estarían actuando como reservorio del gen *mec A* en animales que hospedan bacterias zoonóticas, como el *S. aureus*, ya darse una transferencia horizontal del gen *mec A*, se estaría generando un peligro para la salud animal y salud pública, por las infecciones que causaría SARM.

VI. CONCLUSIONES /RECOMENDACIONES

- El presente estudio, encontró que la probabilidad de encontrar SARM en porcinos de crianza de traspatio es baja, sin embargo confirmó que el gen *mec A* se encuentra distribuido en el género *Staphylococcus* en ganado porcino de crianza de traspatio en el departamento de Tumbes. Así mismo demuestra la potencial capacidad de que los porcinos puedan actuar como reservorios de este gen y eventualmente como una potencial fuente genética para la emergencia de SARM en granjas.
- Se recomienda el monitoreo constante de bacterias saprófitas y patógenas con genes de resistencia para determinar su prevalencia y evolución de resistencia antimicrobiana en el tiempo. Así mismo realizar la epidemiología molecular de sus genes de resistencia, para determinar su origen.
- Por otro lado, se sugiere realizar estudios en granjas tecnificadas de la región para evaluar el efecto del tipo de crianza y uso de los promotores de crecimiento, en la presencia de SARM y el gen *mec A* en la producción animal. Se recomienda se esfuercen e implementen medidas de sobre el uso indiscriminado de antibióticos en prácticas de automedicación o como promotores de crecimiento que pueden derivar en la emergencia de bacterias resistentes a antimicrobianos con potencial zoonótico y

antropozoonótico. Asimismo, complementar con campañas de información a la comunidad acerca de las causas y riesgos para la diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

VII. LITERATURA CITADA

1. Alarcón T, Sanz JC, Blanco F, Domingo D, and López-Brea M. 1998. High-level mupirocin resistance among Spanish methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *E J Clin Microbiol and Infect Dis*. 17: 877-879.
2. Appelbaum PC. 2006. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 12 (suppl.1): 16-23.
3. Archer GL, Bosilevac JM. Signaling antibiotic resistance in staphylococci. *Science* 2001; 291:1915-6.
4. Armand-Lefvere L, Ruimy R, Andreumont A. [2005]. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls and pigs. *Emerg Infectious Diseases* 11: 711 – 714.
5. Arriola CS, Güere ME, Larsen J, Skov RL, Gilman RH, et al. (2011) Presence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs in Peru. *PLoS ONE* 6(12): e28529. doi:10.1371/journal.pone.0028529
6. Bannerman TL. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. A: *Manual of Clinical Microbiology*. 8^a Ed. Editor: P.R. Murray. ASM Press, Washington D.C. (EEUU).

7. Barber M. 1947. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. Br Med J. 2:863-865.
8. Barret F F, Mc GHEE R P, FINLAND M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston City Hospital. NEJM 1968; 279: 441-8.
9. Beck WD, Berger-Bächi B and Kayser FH. 1986. Additional DNA in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec-specific DNA. J Bacteriol. 165: 373-378.
10. Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strässle A, and Kayser FH. 1989. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistant in *Staphylococcus aureus* molecular cloning and characterization. Mol Gen Genet. 219: 263-269.
11. Berger-Bächi B. 1994. Expression of resistance to methicillin. Trends in Microbiology. 2:389-393.
12. Bes M., Brun Y. *Staphylococcus*: Actualités taxonomiques et identification. Revue Francaise des Laboratoires. 2002; 343: 23-30.
13. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed 17: 287-305.
14. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 27 (1), 44-52.
15. Callisaya HJ, Sarmiento Z, Choque H. 2007. Prevalencia de portadores nasales de *Staphylococcus aureus* en el personal de limpieza del Hospital Obrero. BIOFARBO 15 (1): 55-60.
16. Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. Vet Microbiol, 150:344-348.
17. Chambers H.F., Hartman B.J. and Tomasz A. 1985. Increased amounts of a novel penicillin-binding proteins in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. J Clin Invest. 76: 325-331.
18. Chambers H.F. 1987. Coagulase-negative staphylococci resistant to betalactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. Antimicrob Agents Chemother. 31: 1919-1924.

19. Chambers H.F., Sachdeva M.J., hackbarth C.J. 1994. Kineics of penicillin binding protein to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. Biochem J. 301:139-144.
20. Changanaqui C. 2010. Presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.54 p.
21. Cookson BD. 1998. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. J Antimicrob Chemother. 41(1):11-8.
22. Crisetti E., Cataleta A., Onni T., Cafiero M. A., Tola S., La Salandra G. (2011). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy products from the Apulia region, Italy. Abstracts of the 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (Milan), Clin. Microbiol. Infect. abstr. 17, P899.
23. Crossley K, Landesman B, Zaske D. 1979. An outbreak of infection caused by a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. J Infect Dis. 139: 280-287.
24. Cuny C., Nathaus R., Layer F., Strommenger B., Altmann D., Witte W. (2009). Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. PLoS ONE 4, e6800.
25. Díaz GA, Ferrán J. [2004]. Género *Staphylococcus*. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. [Internet]. [16 de Enero del 2010].
26. De Boer E., Zwartkruis-Nahuis J. T., Wit B., Huijsdens X. W., de Neeling A. J., Bosch T., van Oosterom R. A., Vila A., Heuvelink A. E. (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. Int. J. Food Microbiol. 134, 52–56.
27. De Lencastre H., De Jonge B.L.M., Matthews P.R., Tomasz A. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1994; 33: 7-24.
28. De Lencastre H, Severina EP, Milch H, Thege MK, Tomasz A. 1997. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. Clin Microbiol Infect. 3: 289-96.

29. De Neeling A. J., van den Broek M. J., Spalburg E. C., van Santen-Verheuevel M. G., Dam-Deisz W. D., Boshuizen H. C., van de Giessen A. W., van Duijkeren E., Huijsdens X. W. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 366–372.
30. Deleo F. R., Otto M., Kreiswirth B. N., Chambers H. F. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557–1568.
31. Denis O., Suetens C., Hallin M., Catry B., Ramboer I., Dispas M., Willems G., Gordts B., Butaye P., Struelens M. J. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infect. Dis.* 15, 1098–1101.
32. Díaz GA, Ferrán J. (2004). Género *Staphylococcus*. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos.
33. Diekema D. J., Pfaller M. A., Schmitz F. J., Smayevsky J., Bell J., Jones R. N., Beach M. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32(Suppl. 2), S114–S132.
34. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. [2009]. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd Edition. Charlottetown, Canada.
35. EASAC. Combating the threat of zoonotic infections. EASAC Policy report 2008; <http://www.easac.org>.
36. EASAC. Tackling antibacterial resistance in Europe. 2007. ISBN: 9780854036387.
37. Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 38:1008-1015.
38. Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:7687-92. European Antimicrobial Resistance Sur
39. Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *J Clin Invest* 2004; 114:1693-6.

40. Francis J. S., Doherty M. C., Lopatin U., Johnston C. P., Sinha G., Ross T., Cai M., Hansel N. N., Perl T., Ticehurst J. R., Carroll K., Thomas D. L., Nuermberger E., Bartlett J. G. (2005). Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. Clin. Infect. Dis. 40, 100–107.
41. Fleming A. On the antimicrobial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of H. influenzae. Br J Exp Pathol 1929; 10: 226.
42. Francis J. S., Doherty M. C., Lopatin U., Johnston C. P., Sinha G., Ross T., Cai M., Hansel N. N., Perl T., Ticehurst J. R., Carroll K., Thomas D. L., Nuermberger E., Bartlett J. G. (2005). Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. Clin. Infect. Dis. 40, 100–107.
43. Gonzalez A. 1987. Presencia de anticuerpos de Influenza A en aves, Lima 1986. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
44. Guardabassi L., Stegger M., Skov R. (2007). Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish slaughter pigs. Vet. Microbiol. 122, 384–386.
45. Güere M. 2013. Prevalencia y evaluación de los niveles de resistencia a oxacilina de cepas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) obtenidas con métodos selectivos en cerdos en acabado provenientes de seis granjas tecnificadas en Lima, Perú. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 59p
46. Hansen A, Kjeldsen G, Ericson Sollid J. 2004. Local variants of staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?. Antimicrob Agents Chemother. 48: 285-296
47. Hartman B.J. and Tomasz A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 158: 513-516.
48. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001; 9:486-93.

49. Hiramatsu K, et al. 1997. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.*40: 135-136.
50. Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito.2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 9:486-493.
51. Hiramatsu K. 2004. Elucidation of the mechanism of antibiotic resistance acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and determination of its whole genome nucleotide sequence. *JMAJ.* 47: 153-9.
52. Howe RA, Brown NM, Spencer RC. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. *J Clin Pathol* 1996; 49:444-9.
53. Imsade J. 1978. Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* 42: 67-83.
54. Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C., Hiramatsu K. (2001).Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*45, 1323–1336.
55. Ito T., Ma X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase,*ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2637–2651.
56. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A. Del antibiograma a la prescripción. Capítulo: Principales fenotipos de resistencia de las bacterias gran positivas. En: Baquero F, Cantón R. Ed: Del antibiograma a la preescrición. Pag.76-77. Éditions Biomérieux. 2^a edición marzo 2004. Francia/T.L.McCann. Santé Lyon. RCS Lyon B 398160242.
57. Jevons MP. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br Med J* 1961; 1: 124-125
58. Kanafani ZA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24:182-93.
59. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*44, 1549–1555.

60. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Hirose K, Miyake M, Shu SE, Ezaki T . [1998]. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. J Clin Microbiol 36: 2038-2042
61. Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J. S. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet. Microbiol. 128, 298–303
62. Kirby WMN. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin. Science. 99:452-453.
63. Klevens R. M., Edwards J. R., Tenover F. C., McDonald L. C., Horan T., Gaynes R. (2006). Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. Clin. Infect. Dis. 42, 389–391.
64. Kluytmans J. A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? Clin. Microbiol. Infect. 16, 11–15.
65. Knox R. “Celbenin”- resistant staphylococci. Br Med J 1961; 1: 126
66. Kock R., Becker K., Cookson B., van Gemert-Pijnen J. E., Harbarth S., Kluytmans J., Mielke M., Peters G., Skov R. L., Struelens M. J., Tacconelli E., Navarro Torne A., Witte W., Friedrich A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Euro Surveill. 15, 19688
67. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit W, Eisner W, Maslow J, McGeer A, et al. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. 259: 227-230.
68. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr Jr. [1997]. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th Edition. Philadelphia, USA. Lippincott. 1395pp.
69. Lim, D. and Strynadka, N.C. 2002. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat. Struct. Biol. 9: 870-876.
70. Ma X., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R., Hiramatsu K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette

- chromosome identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1147–1152
71. Maes N, Magdalena J, Rottiers S, De Gheldre Y, Struelens MJ. [2002]. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative *Staphylococci* and determine methicillin resistance from blood cultures.
 72. Massidda O, Montanari MP, Mingoia M, and Varaldo PE. 1996. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain have more in common that reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob Agents Chemother. 40: 2769-2774.
 73. McDougal LK, Thomsberry C. 1986. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol. 23: 832-839
 74. Marin M, Gudiol F. 2003. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 21(1): 42-55.
 75. Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, Inoue M, and Nakajima Y. 1998. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 167: 221- 227.
 76. Mediavilla A, García-Lobo JM. 2003. Antibióticos β -lactámicos. En: Florez J. Farmacología Humana. 3ª ed. Barcelona: Masson. p 1105-1128
 77. Miller L. G., Perdreau-Remington F., Rieg G., Mehdi S., Perlroth J., Bayer A. S., Tang A. W., Phung T. O., Spellberg B. (2005). Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. N. Engl. J. Med. 352, 1445–1453
 78. Morgan M. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? J. Antimicrob. Chemother. 62, 1181–1187. doi: 10.1093/jac/dkn405.
 79. Musser J, Kapur V. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the

- mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. J Clin Microbiol. 30: 2058–63.
80. Neuhaus FC, Georgopapadakou, N. Strategies in β -lactam desingn. En: Sutcliffe J, Georgopapadakou, NH (Eds). Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy. Chapman and Hall, New York 1992; 205-273.
 81. Ogston A. 1883. Micrococcus poisoning. J Anat Physiol. 17: 24-58.
 82. Pantosti A., Sanchini A., Monaco M. (2007).Mechanisms of antibiotic resistance in*Staphylococcus aureus*. Future Microbiol.2, 323–334.
 83. Prescott LM, Harley JP, y Klein DA. 1999. Microbiología. 1ª. Ed. Madrid; Mc Graw-Hill-INTERAMERICANA DE ESPAÑA
 84. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, y Hartigan PJ. 2011 Staphylococcus species. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2.^a ed. Chichester, West Sussex, UK; Wiley-Blackwell. Pp. 179-187.
 85. Rodríguez-Baño J, Millán AB, Domínguez MA, Almirante B, Cercenado E, Padilla B, Pujol M y GEIH/GEMARA/REIPI. 2006. Medidas de control de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en hospitales españoles. Encuesta del proyecto SARM 2003 GEIH/GEMARA/REIPI. Enferm Infecc Microbiol Clin. 24:149-156.
 86. Sabath LD, Wheeler N, Laverdiere M, Blazevic D, Wilkinson BJ. 1977. A new type of penicillin resistance of Staphylococcus aureus. Lancet. 1: 433.
 87. Salvador C, Acevedo C, Bennani A. 2005. Técnicas para la detección de Staphylococcus aureus resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica. AEFA. Disponible en:http://www.pncq.org.br/biblioteca/actualidades2005_11.pdf
 88. Schmitz FJ, Lindenlauf E, Hofmann B, Fluit AD, Verhoef J, Heinz HP, and Jones ME. 1998. The prevalence of low-and high-level mupirocin resistance in staphylococci from 19 European hospitals. J Antimicrob Chemother. 42: 489-495.
 89. Shanson DC. Antibiotic-resistant Staphylococcus aureus. 1981. J Hosp Infect.2:11-36.

90. Shitu AO, Lin J, Kolawole DO. [2006]. Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and characterization of MRSA in Southwestern Nigeria. *Wounds* 18: 77 – 84.
91. Sierra-Madero JG, Knapp C, Karaffa C, Washington JA. 1988. Role of β -lactamase and different testing conditions in oxaciline-bordelinesusceptible staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 32: 1754-1757.
92. Smith T. C., Male M. J., Harper A. L., Kroeger J. S., Tinkler G. P., Moritz E. D., Capuano A. W., Herwaldt L. A., Diekema D. J. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS ONE* 4, e4258.
93. Sopena N, García-Nuñez M, Prats R, Pedro-Bonet ML, Elía S, Nieto J and Sabriá M. 2001. Appearance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sensitive to gentamicin in a hospital with a previous endemic distinct MRSA. *Eur J Epidemiology.* 17: 317-321.
94. Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mec-A* gene distribution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36: 429–34.
95. Stewart GT, Holt RJ. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *BMJ* 1963; 1:30811.
96. Tomasz A. Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. 1989. New mechanisms for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* 33: 1869-1874.
97. Ubukata k., Yamahita N. and Konno M. 1985. Occurrence of a beta lactaminducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 170-172.
98. Van Belkum A, Melles DC, Peeters JK, Van Leeuwen WB, Van Duijkeren E, Huijsdens XW, Spalburg E, De Neeling AJ, Verbrugh HA. 2008. Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *J Emerg Infect Dis* 14: 479-483.
99. Van Belkum A., Melles D.C. Not all *Staphylococcus aureus* strains are equally pathogenic. *Discovery Medicine.* 2005; 5(26): 148–15.

100. Van Belkum A., Melles D.C., Nouwen J., van Leeuwen W.B., van Wamel W., Vos M.G., Wertheim H.F.L., Henri A., Verbrug H.A. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009; 9: 32–47.
101. Van Duijkeren E, Houwers DJ, Schoormans A, Broekhuizen-Stins MJ, Ikawaty R, Fluit AC, Wagenaar JA. [2008]. Transmission of methiciline-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Vet Microbiol* 128[1-2]: 213 – 215.
102. Van Enk RA, Thompson KD. [1992]. Use of a primary isolation medium for recovery of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 30[2]: 504 – 505.
103. Van Loo I., Huijsdens X., Tiemersma E., de Neeling A., van de Sande-Bruinsma N., Beaujean D., Voss A., Kluytmans J. (2007). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging Infect. Dis.* 13, 1834–1839.
104. Vanderhaeghen W., Hermans K., Haesebrouck F., Butaye P. (2010b). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol. Infect.* 138, 606–625.
105. Vásquez JE, Walker ES, Franzus BW, Overbay BK, reagan DR, and Sarubbi FA. 2000. The epidemiology of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Veterans' Affairs Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 21: 459-464.
106. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilinoresistente. *Salud Pública Méx* 2005; 47:381-7.
107. Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infect. Dis.* 11, 1965–1966.
108. Weese J. S. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J.* 51, 233–244.
109. Weese J. S., Caldwell F., Willey B. M., Kreiswirth B. N., McGeer A., Rousseau J., Low D. E. (2006). An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Vet. Microbiol.* 114, 160–164.

110. Wielders CLC, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, and Schmitz FJ. 2002. *mecA* Gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. J Clin Microbiol. 40: 3970-75
111. Winn WC y Koneman EW. 2006. Koneman's Color atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins.
112. Wulf M. W., Markestein A., van der Linden F. T., Voss A., Klaassen C., Verduin C. M. (2008a). First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. Euro Surveill. 13, pii8051.
113. Wulf M. W., Sorum M., van Nes A., Skov R., Melchers W. J., Klaassen C. H., Voss A. (2008b). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. Clin. Microbiol. Infect. 14, 29–34.
114. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signalling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. Science 2001; 291:1962-5.
115. Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, Hirose K, Miyake M, Shu S-E, Ezaki T. Distribution of *Staphylococcus* Species among Human Clinical Specimens and Emended Description of *Staphylococcus caprae*. J Clin Microbiol. 1998;36(7):2038–2042.
116. Shittu A, Lin J, Morrison D, Kolawole D. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 3):317–324.
117. David P Kateete, Cyrus N Kimani, Fred A Katabazi, Alfred Okeng, Moses S Okee, Ann Nanteza, Moses L Joloba, Florence C Najjuka. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9: 23. Published online 2010 August 13.

VIII. ANEXOS

ANEXO1. PROTOCOLO DE SIEMBRA EN AGAR MANITOL SAL CEFOXITINA

1. Sembrar por barrido en placa agar manitol sal cefoxitina.
2. Dejar las placas en la estufa por 48 horas a 37°C.
3. De dar positivo el agar virará al color amarillo.
4. Escoger colonias redondas, pequeñas, de color variable entre gris y amarillo.

Datos:

De dar positivo se observará el viraje de color rosado característico del agar hacia un color amarillo.

Este agar permite identificar bacterias del género *staphylococcus* resistentes a metilicina.

ANEXO 2. PROTOCOLO DE SIEMBRA EN AGAR SANGRE

1. Sembrar colonias elegidas de placas agar manitol sal cefoxitina en placas agar sangre
2. Llevar las placas con agar sangre 5% a estufa por 24 horas a 37°C.
3. Proceder a la observación de colonias.
4. Realizar evaluación morfológica de las bacterias aisladas.

Datos:

De dar positivo se observará características fenotípicas como:

- a. Morfología: colonias redondeadas y aplanadas de bordes netos, superficie lisa y brillante.
- b. Coloración dorada de las colonias
- c. Hemólisis

ANEXO 3. PROTOCOLO DE INOCULACIÓN EN CALDO CEREBRO CORAZÓN (BHI)

1. En tubos de vidrio colocar 4 ml de BHI
2. Inocular de 2-3 colonias aisladas en agar sangre 5% fenotípicamente compatibles con *staphylococcus*.
3. Colocar a estufa a 37°C por 24 horas

ANEXO 4. PROTOCOLO DE PRUEBA DE COAGULASA EN TUBO:

1. En un tubo de vidrio colocar 0.1 ml de caldo cerebro corazón inoculado 24 horas antes con *staphylococcus*.
2. Adicionar al tubo 0.3 ml de plasma de conejo
3. Colocar a estufa a 37°C por 4 horas, evaluar si pasado este tiempo se formó el coágulo
4. Los tubos que no formaron el coágulo, se llevaran a estufa por 18 horas más.

Datos:

Aquellos tubos donde se observe la formación del coágulo serán calificados como coagulasa positivos y serán seleccionados para la realización de la prueba de reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

ANEXO 5. PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN

1. Alicuotar 1 ml en tubos Eppendorf.
2. Colectar del agar sangre una ansada llena de colonias de bacterias por muestra. suspender en el tubo Eppendorf.
3. Llevar al vortex por 15 s.
4. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 min.
5. Eliminar el sobrenadante
6. Resuspender el pellet en 100 µl de 1 X TE
7. Homogenizar con la pipeta

8. Calentar la suspensión a 95 ° C por 10 minutos.
9. Transferir inmediatamente al hielo por 10 minutos.
10. Añadir 900 µl de buffer 1 X TE
11. Almacenar a -20° C.

ANEXO 6. PROTOCOLO PCR GENES 16 S, NUC Y MEC A

Preparación Mix PCR:

1. Preparar en el flujo laminar (sala libre de ADN)
2. Colocar todos los materiales antes de comenzar a trabajar.
3. Prender la luz UV del flujo por 15 minutos.
4. Apagar la luz UV.
5. Mezclar el Mix PCR en un tubo Eppendorf.
6. Alicuotar 20 µl del Mix PCR en cada tubo PCR 200 µl.

Adición del Template:

1. Rotular los tubos con el mix PCR.
2. Añadir 5 µl de agua destilada estéril al tubo de PCR destinado como blanco.
3. Añadir 5 µl del template al mix PCR en el tubo PCR.
4. Mezclar con la pipeta
5. Centrifugar por 2 segundos en la microcentrífuga.

PCR

1. Colocar los tubos PCR en el termociclador.
2. Seleccionar el programa PCR correspondiente al gen.

Condiciones PCR: <i>16 S</i>		
1 CICLO	30 CICLOS	1 CICLO
94°Cx5 min	94°Cx30s	72°Cx7 min
	55°Cx30s	HOLD
	72°Cx30s	4°C

CondicionesPCR <i>Nuc</i>		
1 CICLO	30 CICLOS	1 CICLO
94°Cx5 min	94°Cx30s	72°Cx7 min
	52°Cx30s	HOLD
	72°Cx30s	4°C

Condiciones PCR: <i>mec A</i>		
1 CICLO	30 CICLOS	1 CICLO
94°Cx5 min	94°Cx30s	72°Cx7 min
	50°Cx30s	HOLD
	72°Cx30s	4°C

Datos:

- Correr los productos del PCR en gel agarosa al 1 %.

ANEXO 7.FLUJOGRAMA DEL MÉTODO EXPERIMENTAL.

